



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Camila Martins Gomes Moraes

ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE METALODROGA ASSOCIADA À CINCHONINA.

NATAL/2018

CAMILA MARTINS GOMES MORAIS

ATIVIDADE ANTIPLAMÓDICA DE METALODROGA ASSOCIADA À CINCHONINA.

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Parasitária na área de Parasitologia.

Orientador: Professor Doutor Valter Ferreira de Andrade Neto.

Natal/2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Morais, Camila Martins Gomes.

Atividade antiplasmodica de metalodroga associada à
Cinchonina / Camila Martins Gomes Moraes. - Natal, 2018.
76 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande
do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Parasitária.

Orientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto.

1. Antimaláricos - Dissertação. 2. Plasmodium berghei ANKA -
Dissertação. 3. Plasmodium falciparum - Dissertação. 4.
Metalodrogas - Dissertação. 5. Cinchonina - Dissertação. I.
Andrade Neto, Valter Ferreira de. II. Universidade Federal do
Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616.936

Elaborado por KATIA REJANE DA SILVA - CRB-15/351

Agradecimentos

À minha mãe, meu pai e meu irmão, pelo apoio incondicional durante toda minha vida acadêmica, por proporcionar este e todos os outros momentos memoráveis da minha vida;

Ao meu marido Guilherme Oliveira, pelo suporte e compreensão, pelos diversos momentos de discussão sobre a pesquisa e pela companhia;

Ao meu orientador Valter Andrade, por todo incentivo nas situações mais difíceis, por todos os ensinamentos ao longo do mestrado, pelo maravilhoso coração que possui;

A todos os meus colegas pesquisadores do Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose, pela família que formamos, pelas colaborações ao longo dessa jornada, principalmente Silvano Brito, Valeska Pereira, Ramayana Brito, Alison Michel, Sarah Rejane e Ana Glória, por toda a dedicação a este trabalho;

À professora Antônio Cláudia Jácome da Câmara e professora Naisandra Bezerra da Silva Farias, pelo suporte e colaboração que permitiram a realização deste trabalho;

À Aleksandra Weselucha-Birczynska, pela colaboração que promoveu o enriquecimento desta pesquisa e pela solicitude;

À minha turma de mestrado maravilhosa Denis Dantas, Julliette Medeiros, Nathalie Sena, principalmente às minhas amigas Márgore Lorena, Hannaly Wana e Brenda Elen por compartilharem comigo os sucessos e fracassos ao longo deste caminho;

Às minhas amigas Camila Moreira, Kamylla Queiroz, Ticiane Melo, Monalisa Melo e Paloma Gomes, pelo apoio emocional, por compreenderem minhas ausências e pelas palavras de acalanto e força necessárias para que diariamente eu enfrente meus desafios;

A CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro;

A todos que participaram e colaboraram para que esta pesquisa fosse realizada.

RESUMO

Atualmente, o tratamento quimioterápico é a única forma de controle da malária, e o desenvolvimento de novos fármacos com ação antimalárica de baixo custo, baixa toxicidade e eficazes são imprescindíveis. Esta busca proporcionou a associação de metais, que podem potencializar a ação antiplasmodica do composto e diminuir sua toxicidade. Nesse sentido, foi avaliada a atividade antiplasmodica da cinchonina ligada ao cobre e da cinchonina sem metais. Para os testes *in vitro*, 7 concentrações seriadas (1:2) das drogas foram utilizadas em cepas de *Plasmodium falciparum* 3D7 e K1, variando de 0,78 a 50 µg/ml. Para análise da supressão da parasitemia, camundongos *swiss* fêmeas, pesando 27 ± 2 g com 6 a 10 semanas de vida foram utilizadas, inoculando 1×10^6 de hemácias parasitadas por *Plasmodium berghei* ANKA e separando-os em 4 animais por grupo, tratados “*per gavage*” por 4 dias consecutivos: Controle negativo tratados com placebo e Tween 20 a 2%; Controle negativo tratados com placebo; Tratados com cinchonina ligada ao cobre; Tratados com cinchonina e; Controle positivo tratado com cloroquina. Foram utilizadas doses de 5 mg/kg a 90 mg/kg. A atividade antimalárica, *in vitro* e *in vivo* foi avaliada pela inibição do crescimento do parasito com a droga teste em relação ao controle sem droga, além da avaliação da mortalidade cumulativa, a citotoxicidade em macrófagos murinos, toxicidade aguda, análises histopatológicas e determinação do índice de seletividade, todos realizados em triplicata. As IC₅₀ nos testes antiplasmodicos *in vitro* variaram de 0,06 a 0,04 µg/ml para cin+Cu e 0,23 a 0,06 µg/ml para cinchonina e o índice de seletividade foi 32 e 122, respectivamente em cepas sensível e resistente a cloroquina. As cinchoninas exibiram atividade antiplasmodica *in vivo* reduzindo a parasitemia nos animais em até 93,3%, apresentando menor mortalidade para os grupos tratados com cinchonina ligada ao cobre. A análise histopatológica apresentou discreta esteatose hepática para a cinchonina e a cin+Cu, e infiltrado inflamatório leve no primeiro composto. Apesar dos resultados promissores, estudos futuros são necessários sobre o mecanismo de ação dos compostos no organismo e ação no bloqueio de transmissão das formas gametocíticas para o vetor.

Palavras-chave: Antimaláricos. *Plasmodium berghei* ANKA. *Plasmodium falciparum*. Metalodrogas. Cinchonina.

ABSTRACT

Currently, the chemotherapeutic treatment is the only way for malaria control and the development of new drugs with antimalarial activity that provides low cost, low toxicity and efficiency is essential. This search provided the metals association, that may increase the antimalarial activity of drugs and decrease toxicity. Therefore, the antiplasmodial activity of cinchonine bounded with copper and cinchonine metal-free was evaluated. For *in vitro* assays, 7 drugs serial concentrations (1:2) ranging from 0,78 to 50 µg/ml was performed in *Plasmodium falciparum* 3D7 and K1 strains. For parasitemia suppression analysis, female swiss mice weighing 27 ± 2 g and 6 to 8 weeks of age was used, inoculating 1×10^6 of *Plasmodium berghei* ANKA parazited erythrocytes, separating them into 4 animals per group and treating “*per gavage*” for 4 consecutive days: Negative control with placebo and Tween 20; Negative control with placebo; Mice-treated with bounded copper cinchonine; Mice-treated with cinchonine; Positive control treated with chloroquine. Doses of 5 mg/kg to 90 mg/kg were used. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity was evaluated by inhibition of parasite growth treated with drug test divided for the control group, further on the evaluation of cumulative mortality, cytotoxicity in RAW cells, acute toxicity, histopathological analyzes and selectivity index, all performed in triplicate. The antiplasmodials *in vitro* assays of IC₅₀ range 0,06 to 0,04 µg/ml for cin+Cu and 0,23 to 0,06 µg/ml for cinchonine and selectivity index was 32 and 122, respectively in chloroquine sensitive and resistente strains. All tested drugs exhibited *in vivo* antiplasmodial activity, reducing parasitemia in 93%, with lower mortality in cinchonine-bounded with copper groups. The histopathological analyzes shows mild hepatic steatosis in groups treated with cinchonine and cin+Cu and inflammatory infiltrate in the first drug. Despite these promising results, further tests about the mechanism of action of these drugs in the body and transmission blocking tests in gametocytes forms are important.

Keywords: Antimalarials. *Plasmodium berghei* ANKA. *Plasmodium falciparum*. metallodrugs. Cinchonine.

Lista de figuras e tabelas

Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Incidência de casos de malária por país entre os anos de 2000 e 2015 | 13 |
| Figura 2: Casos de malária confirmados por 1.000 habitantes na América Latina. | 14 |
| Figura 3: Número de casos de malária notificados na Região Amazônica entre 2015 e 2017..... | 15 |
| Figura 4: Formas trofozoíticas das seis espécies de <i>Plasmodium</i> | 17 |
| Figura 5: Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> | 20 |
| Figura 6: Formas trofozoíticas de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA no 6º dia após a infecção por 1.10^6 eritrócitos infectados.. | 22 |
| Figura 7: Estrutura química das moléculas de: (a) quinina; (b) cloroquina; (c) mefloquina e; (d) artemisina. | 24 |
| Figura 8: Estrutura química com a numeração dos átomos de cinchonina (cin; C8-S, C9-R). | 29 |
| Figura 9: Estruturas químicas dos compostos utilizados. | 32 |
| Figura 10: Atividade antiplasmódica da cinchonina ligada ao cobre e cinchonina alcaloide em seis doses (mg/kg). | 43 |
| Figura 11: Mortalidade cumulativa em porcentagem dos animais tratados com os dois compostos teste..... | 44 |
| Figura 12: Taxa de ganho de peso nos animais tratados com 300mg/Kg. | 47 |
| Figura 13: Corte histológico de secções do fígado a 300 mg/kg | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 14: Análise histológica de secções dos rins a 300 mg/kg..... | 49 |
| Figura 15: Análise histológica representativa de secções dos baços a 300 mg/kg. | 50 |
| Figura 16: Análise histológica de secções do fígado e rim de animais tratados com cloroquina na dose de 10 mg/kg..... | 51 |

Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Esquema de tratamento para malária preconizado pelo Ministério da Saúde, Brasil..... | 23 |
| Tabela 2: Atividade antiplasmodica <i>in vitro</i> realizada por leitura de microscopia para cin+Cu, cin alc e cloroquina em cepa 3D7 e K1 | 40 |
| Tabela 3: Citotoxicidade e índice de seletividade dos compostos testados em células da linhagem RAW..... | 41 |
| Tabela 4: Atividade antimalárica da cinchonina + Cu e cinchonina alcaloide usando o modelo murino de Plasmodium berghei ANKA..... | 42 |
| Tabela 5: Atividade antimalárica <i>in vivo</i> da cinchonina + Cu e cinchonina alcaloide em relação ao controle não tratado. | 45 |
| Tabela 6: Sinais de toxicidade aguda e mortalidade para os compostos cinchonina ligada ao cobre, cinchonina alcaloide e cloroquina em dose de 300 mg/kg..... | 46 |

Equações

| | |
|---|----|
| Equação 1: Cálculo para determinação da porcentagem de supressão de parasitemia. .. | 38 |
|---|----|

Lista de abreviaturas e siglas

CDC – Center of Disease Control

Cin alc – Cinchonina alcaloide

Cin+Cu – Cinchonina ligada ao cobre

Cq – Cloroquina

Ctrl – Controle

CSP – proteína circunsporozoítica

DHFR – Dihidrofolato redutase

DHPS – Dihidropteroato sintase

DL₅₀ – Dose 50 % letal

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

HE – Hematoxilina-eosina

IC₅₀ – Concentração 50% inibitória

MTT – Método colorimétrico metil-tiazol-tetrazólico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PNCM – Programa Nacional de Controle da Malária

PfEMP1 – Proteína de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum*

Pfcr1 – Gene de transporte da resistência à cloroquina de *P. falciparum*

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

TRAP – Proteína anônima relacionada à trombospondina

Tween 20 a 2% – Polissorbato 2%

WHO – World Health Organization

Sumário

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 12 |
| 2.1 | Epidemiologia da malária..... | 12 |
| 2.2 | Caracterização do <i>Plasmodium</i> | 17 |
| 2.3 | Mecanismos de ação de antimaláricos de referência..... | 22 |
| 2.4 | Mecanismos de resistência a antimaláricos..... | 26 |
| 2.5 | Novos antimaláricos..... | 27 |
| 2.6 | Cinchonina e associação a metais..... | 28 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 31 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 31 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 31 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1 | Compostos..... | 32 |
| 4.2 | Manutenção da cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> | 33 |
| 4.3 | Manutenção do modelo murino..... | 33 |
| 4.4 | Manutenção da cepa <i>Plasmodium berghei</i> ANKA in vivo..... | 34 |
| 4.5 | Atividade antiplasmodial in vitro..... | 34 |
| 4.6 | Ensaio de citotoxicidade celular..... | 35 |
| 4.7 | Atividade antiplasmódica in vivo..... | 37 |
| 4.8 | Avaliação da toxicidade aguda in vivo..... | 38 |
| 5 | RESULTADOS..... | 40 |
| 5.1 | Atividade antiplasmodial in vitro..... | 40 |
| 5.2 | Citotoxicidade celular..... | 41 |
| 5.3 | Atividade antiplasmodial in vivo..... | 42 |
| 5.4 | Toxicidade aguda in vivo..... | 47 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 52 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 58 |
| 8 | PERSPECTIVAS..... | 59 |
| | REFERENCIAS..... | 60 |

1 INTRODUÇÃO

A malária é a principal doença infecciosa do mundo, sendo predominante nos trópicos e subtrópicos. Apresenta alta mortalidade e morbidade, afligindo 91 países principalmente os mais pobres e sem condições sanitárias do continente africano. Atualmente, a prevalência varia de 148-304 milhões de casos, com uma taxa de mortalidade anual variando de 235-639 mil óbitos (WHO, 2017). Em regiões não endêmicas, os casos de malária têm aumentado e são de grande preocupação pública, geralmente associada a fatores sociais, econômicos, políticos, além da resistência aos antimaláricos existentes (WHO, 2017). No Brasil, a região amazônica representa 99% dos casos da doença no país, sendo considerada região endêmica da malária na América do Sul. Em 2017, os casos de malária no Brasil foram de 174.522, número que representa um aumento de 48% em relação a 2016 (OPAS, 2017). A transmissão elevada nesta região ocorre devido às condições socioeconômicas e ambientais favoráveis para transmissão da doença e principalmente condições ideais para desenvolvimento do vetor. A existência desses fatores de vulnerabilidade e pobreza nas populações que habitam áreas com presença do vetor e transmissão da doença, bem como a falta de um fortalecimento na vigilância epidemiológica nos últimos anos, favoreceram o aumento da malária no Brasil (LAPOUBLE, SANTELLI e MUNIZ-JUNQUEIRA, 2015; OPAS, 2017).

A cada ano, os esforços para a prevenção e controle da malária se intensificam. O uso indiscriminado de inseticidas, ao longo dos anos, para o controle do vetor da doença, os mosquitos do Gênero *Anopheles*, tem induzido a resistência desses animais aos atuais compostos inseticidas (BOAKYE et al., 2009; KUDOM et al., 2013). A mesma preocupação ocorre com o *Plasmodium*, gênero causador da malária, que nas últimas décadas têm adquirido multirresistência aos fármacos antimaláricos atualmente disponíveis de modo mais rápido que o desenvolvimento de novos fármacos (GARDINER

et al., 2009; GARCIA-BUSTOS & GAMO, 2013). Estes estudos demoram vários anos e exigem várias etapas para sua liberação no mercado.

A resolução CNS 251/97 visa comprovar a eficácia dos fármacos testados como novas drogas, avaliando suas aplicações terapêuticas, riscos como efeitos adversos e a toxicidade. Assim ela padroniza a pesquisa pré-clínica em ensaios *in vitro* e *in vivo* para o desenvolvimento de novos compostos, justificando a liberação destas pesquisas em seres humanos a partir da reprodutibilidade da segurança e eficácia destes fármacos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

O interesse no estudo de drogas relacionadas com espécies de plantas já eficazes tem crescido entre os pesquisadores, indicando que modificações na estrutura desses compostos podem ser eficientes, uma vez que as estruturas químicas são semelhantes e distribuídas em grupos de espécies relacionadas, demonstrando que a busca racional a partir de plantas medicinais tem permitido modelos para moléculas sintéticas e híbridas como protótipos para novos antimaláricos (KRETLLI et al., 2001; KRETLLI et al., 2009).

Das plantas do gênero *Cinchona* da família Rubiaceae derivam diversas moléculas alcaloides com potencial antimalárico (HOFHEINZ e MERKLI, 1984). Estes alcaloides pertencem a um amplo grupo de compostos heterocíclicos naturais contendo nitrogênio. Existem cerca de 35 alcalóides derivados da *Cinchona*, dos quais a cinchonidina, quinina, cinchonina e quinidina ocorrem em maior quantidade. A cinchonina, um desses derivados alcaloides, é uma base fraca e atravessa o gradiente de pH das hemácias para se acumular nos vacúolos ácidos dos parasitos, um importante mecanismo na sua ação antimalárica (WESELUCHA-BIRCZYNSKA, 2004).

Partindo do interesse na busca por novos compostos com ação antiplasmodica e do desenvolvimento de pesquisas com a inserção de compostos metálicos para potencializar a atividade antimalárica (HARPSTRITE et al., 2003; SALAS e HERMANN, 2013), este estudo abordou a atividade antiplasmodica, citotoxicidade e toxicidade aguda da cinchonina e sua associação a metais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da Malária

A malária é uma das doenças tropicais e subtropicais de maior prevalência, apresentando um dos maiores índices de morbidade e mortalidade dentre as doenças parasitárias no mundo. Globalmente, cerca de 90% dos casos da doença são registrados no continente africano, 7% na região do sudeste da Ásia, 2% na região do leste Mediterrâneo e por último a América Latina com menos de 1% dos casos (WHO, 2016). Dentre os 91 países com risco de infecção por malária (FIGURA 1), 15 estão na região subsaariana (exceto a Índia), acometendo em sua maioria crianças abaixo de cinco anos (WHO, 2017). Somente no ano de 2016, estimou-se 216 milhões de casos, um aumento de cerca 2% em relação ao ano de 2015, com 445 mil mortes contabilizadas. Além disso, em todo o mundo, 3,4 bilhões de pessoas estão suscetíveis à infecção, podendo desenvolver a doença (WMR, 2017). Na América Latina, aproximadamente 126.800.000 pessoas encontram-se sob o risco de transmissão (FIGURA 2), onde a maioria dos casos de paludismo nas Américas se concentra na região da Bacia Amazônica com 580 mil casos reportados, seguido pela Colômbia com 115 mil casos da doença (WHO, 2011; RODRÍGUEZ et al., 2011).

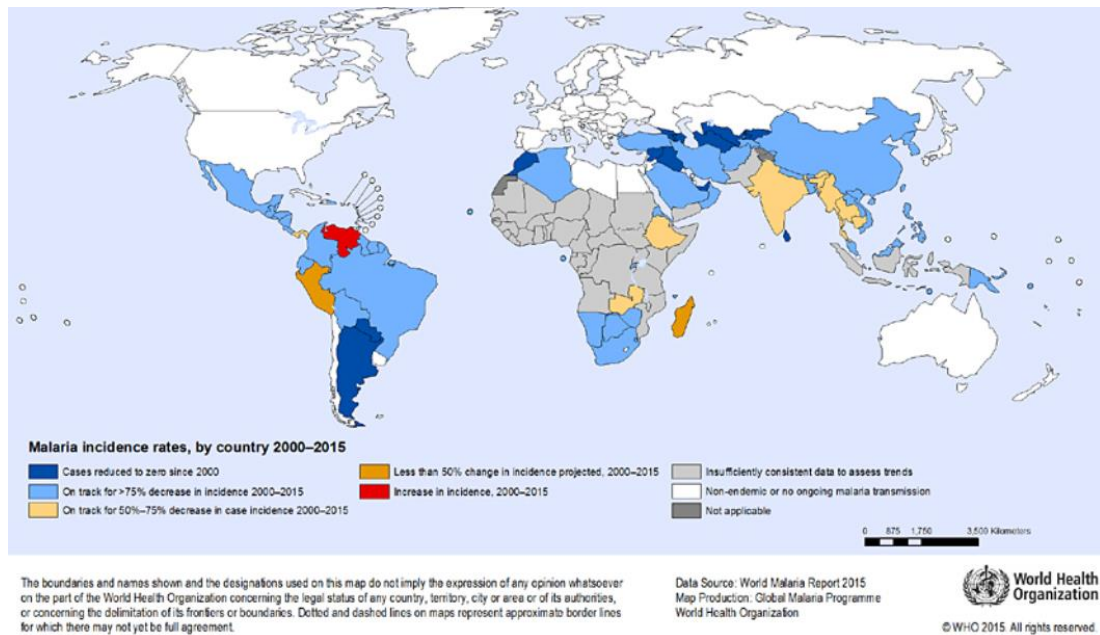


Figura 1: Incidência de casos de malária por país entre os anos de 2000 e 2015. Países em vermelho apresentaram aumento na incidência da doença; Países em laranja apresentaram menos de 50% de mudanças nos casos de incidência; Nos países em amarelo houve a diminuição entre 50% e 75% dos casos de malária; Países em azul claro mostraram mais de 75% de decréscimo na incidência; Países em azul escuro houve redução à zero na incidência da doença malárica. Áreas no mapa marcadas em cinza apresentam dados insuficientes e áreas em branco representam países não endêmicos ou sem transmissão da malária.

Fonte: World Malaria Report 2015. Disponível em: <http://www.who.int/gho/malaria/en/>

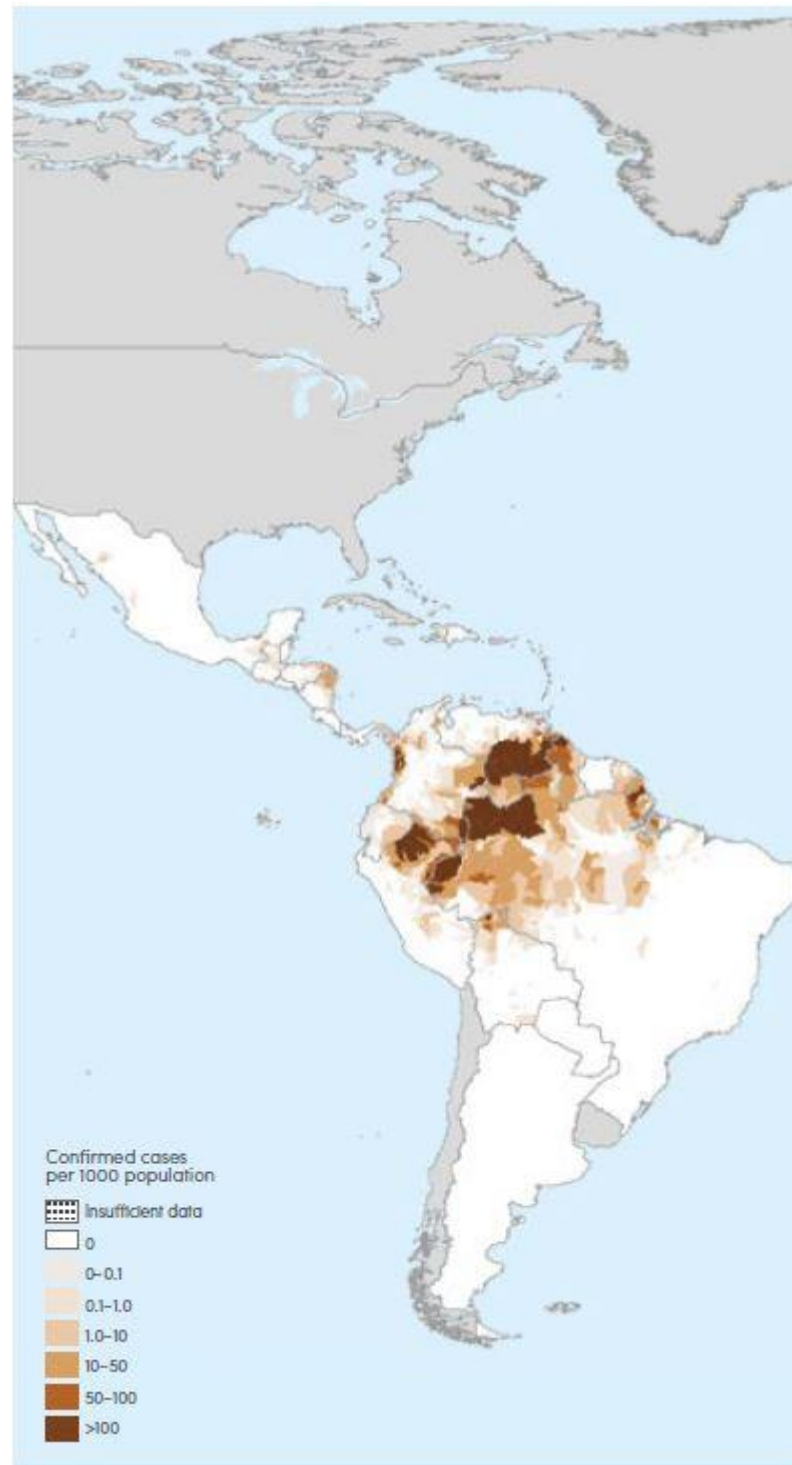


Figura 2: Casos de malária confirmados por 1.000 habitantes na América Latina. As áreas em branco não apresentam registro de casos da doença; As áreas em marrom claro indicam registros de 0,1 a 50 casos em 1.000 habitantes; Áreas em marrom escuro indicam de 50 a mais de 100 casos por 1.000 habitantes.

Fonte: World Malaria Report 2017. Disponível em: <http://www.who.int/gho/malaria/en/>

Segundo o Ministério da Saúde (2017), o Brasil representa mais de 50% dos casos de malária na América Latina e acompanhou o aumento de incidência mundial de casos da doença, apresentando um incremento de 49. 509 casos no ano de 2017 em relação o ano de 2016 na região Amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (FIGURA 3).

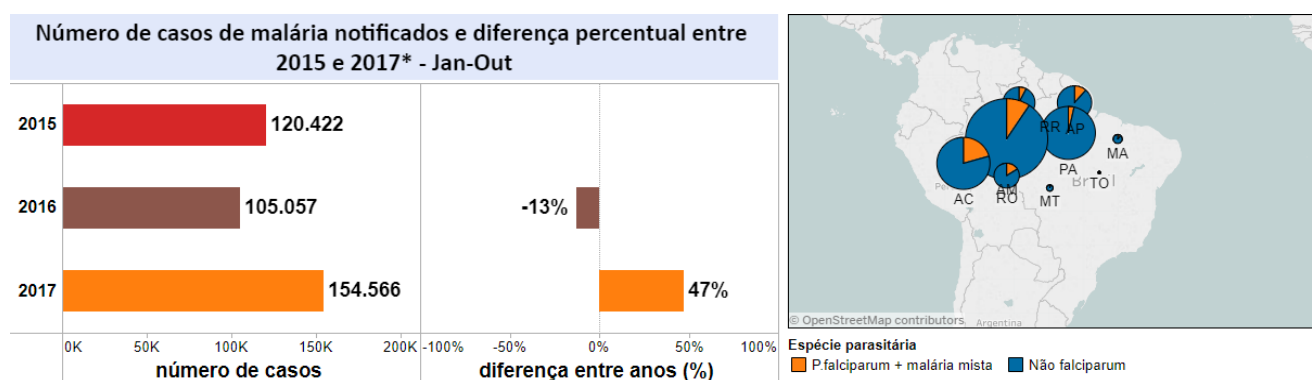


Figura 3: Número de casos de malária notificados na Região Amazônica entre 2015 e 2017. A barra em vermelho mostra o número de casos de malária notificados em 2015. As barras em marrom apresentam o número de casos em 2016 e a redução de 13% dos registros entre 2015 e 2016. As barras em laranja são referentes ao número de casos até Outubro de 2017 e o incremento de 47% de notificações da doença no mesmo período. Os gráficos de proporção mostram maior incidência de casos de malária não falciparum em relação aos casos de malária causada por *Plasmodium falciparum*.

Fonte: SIVEP-MALÁRIA/SVS - Ministério da Saúde. Dados atualizados em: 054/01/2018. * Dados de 2017 são preliminares, podendo sofrer alterações. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1517_2018_01_04/casos_notificados_2017_regio_Amaznica

O aumento cumulativo dos casos de malária de 2015/2016 até julho de 2017 foi de 28%, fechando o ano de 2017 com aumento no número de casos de malária no Brasil em 48% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; OPAS, 2017). Esta região representa 99% dos casos da doença no país, pois apresenta condições socioeconômicas e ambientais favoráveis para transmissão da doença, e principalmente condições ideais para desenvolvimento do vetor (LAPOUBLE, SANTELLI e MUNIZ-JUNQUEIRA, 2015). Na região extra-amazônica foram notificados 499 casos entre 2007 e 2016, sendo 80% dos casos confirmados importados de estados localizados na região endêmica brasileira, de

outros países amazônicos, do continente africano ou do Paraguai (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As espécies de *Plasmodium* encontradas em casos autóctones no país são *Plasmodium vivax*, com 87,7% das notificações, *Plasmodium falciparum* com 16,3% e apenas uma pequena parcela dos casos decorrentes da infecção por *Plasmodium malariae*; com 2% de casos de malária mista (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). No Brasil, aproximadamente 143 mil casos são registrados por infecção do *P. vivax*. Estes dados são preocupantes para o Brasil, uma vez que a malária causada por *P. vivax* é bastante negligenciada por ser considerada como doença benigna e desde 1990 são reportados casos clínicos graves e óbitos relacionados à infecção por esta espécie, inclusive com casos de resistência à cloroquina e mefloquina (ALECRIM et al., 1999; QUINTERO et al. 2011). Somente no ano de 2000, a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas relatou aumento na gravidade da doença e notificaram um número de hospitalizações similar às reportadas por *P. falciparum*, sendo suas principais manifestações clínicas além do paroxismo malárico a icterícia, síndrome da angústia respiratória aguda e anemia grave (ALEXANDRE et al., 2010).

Na região Amazônica, o índice de letalidade é baixa (2/100.000 habitantes), enquanto no restante do Brasil o número pode ser 100 vezes maior. Entre 2010 e 2013, foram registrados uma média de 246, sendo a região Sudeste com 46, 3 % de óbitos, região Nordeste, com 25,7 % dos casos e a região Norte em último lugar, com 5,8 % dos casos de óbito notificados, sendo o índice de letalidade fora de área endêmica de 2 contra 0,02 na Amazônia legal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Este número elevado de óbitos em região extra-amazônica ocorre pela falta de suspeita clínica, e como consequências têm o diagnóstico tardio e tratamentos inadequados ou atrasados, uma vez que a malária é uma doença de fase aguda. Este quadro pode causar complicações e levar o paciente a óbito em uma semana, além de ser confundida com outras doenças que causam sintomas parecidos como febre tifoide, febre amarela, dengue, febre de chikungunya, dentre outras (BRESSAN, 2009; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; MANDAL, 2014; PINA-COSTA et al., 2014).

2.2 Caracterização do *Plasmodium*

Os protozoários do gênero *Plasmodium* pertencem ao grupo dos Apicomplexa, inseridos no táxon Alveolata. São caracterizados pela presença de um complexo apical composto por anéis polares, rôptrias, micronemas, conóide de microtúbulos subpeculiares que exercem função essencial na invasão do parasito na célula do hospedeiro (ADL et al., 2005; 2012). Atualmente, cinco são as espécies que infectam o ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, com relato recente de malária humana no Brasil causada por *Plasmodium simium* (FIGURA 4) (WHO, 2016; PATRÍCIA-BRASIL et al., 2017). Estes parasitos apresentam formas invasivas intracelulares quando presentes no hospedeiro vertebrado e formas invasivas intracelulares e extracelulares em hospedeiros invertebrados (CARTER et al., 2007).

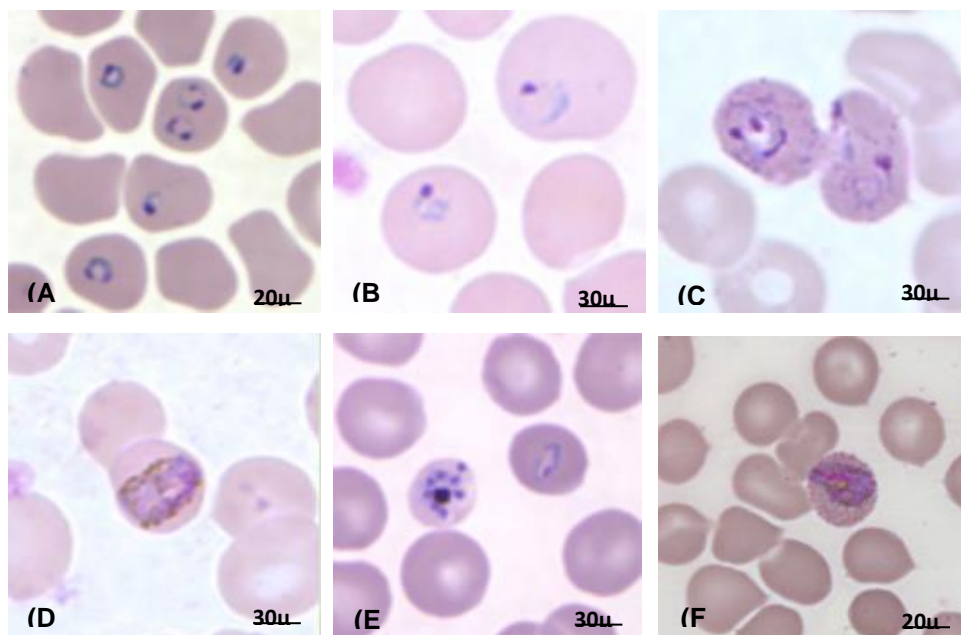


Figura 4: Formas trofozoíticas das seis espécies de *Plasmodium*. Imagens obtidas a partir da confecção de esfregaços sanguíneos. (A) *Plasmodium falciparum*; (B) *Plasmodium vivax*; (C) *Plasmodium ovale*; (D) *Plasmodium malariae*; (E) *Plasmodium knowlesi*; e (F) *Plasmodium simium*.

Fonte: Adaptado de CDC (2016) e Patrícia-Brasil et al. (2017). Disponível em:

<http://www.cdc.gov/malaria/index.html>

A malária é uma patologia infecciosa de característica febril aguda conhecida popularmente como paludismo, maleita, impaludismo, febre intermitente, febre terçã maligna (malária-*falciparum*), febre terçã benigna (malária-*vivax*) e febre quartã (malária-*malariae*). Sua sintomatologia clínica é resultado da reprodução assexuada por esquizogonia e nesta fase do ciclo biológico, o parasito cliva a hemoglobina presente nos eritrócitos, fazendo a hidrólise da globina, obtendo as purinas pré-formadas e liberando o grupo heme, que é convertido em hemozoína, conhecido como pigmento malárico (GARDNER et al., 2002; EGAN, 2008; CHUGH et al., 2013). Com a ruptura das hemácias infectadas, há a liberação dos merozoítos, metabólitos dos parasitos e material celular do hospedeiro na corrente sanguínea, estimulando a ativação de macrófagos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF. Este processo promove a hemólise, liberando a hemoglobina que reage com óxido nítrico, inativando-o, catalisando a produção de radicais livres e causando anemia grave (JIDE et al., 2009; MIOTO et al., 2012; KALANTARI et al., 2014). A interação do parasito com o hospedeiro e a respectiva resposta imunológica inicia os sintomas clínicos da malária como mal estar, cefaleia, fadiga, artralgia e mialgia, precedendo a febre alta característica da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O ciclo de vida do *Plasmodium* é heteroxênico, apresentando um hospedeiro vertebrado no qual ocorre a fase assexuada (esquizogonia), e um hospedeiro invertebrado no qual ocorre a fase sexuada (esporogonia), caracterizando-o como hospedeiro definitivo (FIGURA 5) (WHITE et al., 2014). O ciclo gametogônico tem início com a ingestão de gametócitos do hospedeiro vertebrado infectado durante o repasto sanguíneo do mosquito anofelino. No estômago do hospedeiro invertebrado, os gametócitos se diferenciam em micro e macrogameta (masculino e feminino, respectivamente) e estes passam pelo processo de combinação gênica no intestino médio gerando, primeiramente o oocineto, para depois se diferenciar em oocisto, um zigoto (BILLKER et al., 1998). Em aproximadamente 24 horas são formados oocinetos que possuem motilidade e evadem do intestino médio do inseto, na porção externa da parede do intestino médio e diferenciando-se em oocisto e, entre 10 a 21 dias de crescimento e desenvolvimento, ele se rompe liberando esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do anofelino e posteriormente serão inoculados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do mosquito fêmea (SINDEN, 2002). Ao picar o hospedeiro

vertebrado, em poucos minutos, os esporozoítos migram ao encontro dos hepatócitos, passando através das células de Kupffer por meio da interação entre a CSP (proteína circun-esporozoítica) e TRAP (proteína anônima relacionada à trombospondina) do *P. falciparum* e as cadeias de heparan sulfato da matriz extracelular dos hepatócitos do hospedeiro humano (FREVERT et al., 1993; COWMAN & CRABB, 2006). Nas células do fígado ocorre a esquizogonia tissular com a formação das formas exo-eritrocítica, que em 6 a 16 dias após a infecção, promovem a ruptura do hepatócito e consequente liberação dos merozoítos em vesículas merossomais. São as formas parasitárias merozoíticas que invadem os eritrócitos, se replicam em seu interior produzindo esquizontes e, ao romperem os eritrócitos, liberam merozoítos que irão sucessivamente invadir outras células vermelhas. Em cada ciclo assexuado que ocorre no hospedeiro vertebrado, parte dos merozoítos se diferenciam em gametócitos, e são estes que durante o repasto sanguíneo do mosquito, se desenvolvem no hospedeiro invertebrado (BRUCE et al., 1990; MILLER et al., 2002; GARDINER et al., 2009; MANDAL, 2014; WHITE et al., 2014). A patologia e sintomatologia da doença malárica são desencadeadas pela proliferação assexuada do parasita nas células vermelhas do sangue (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC], 2016).

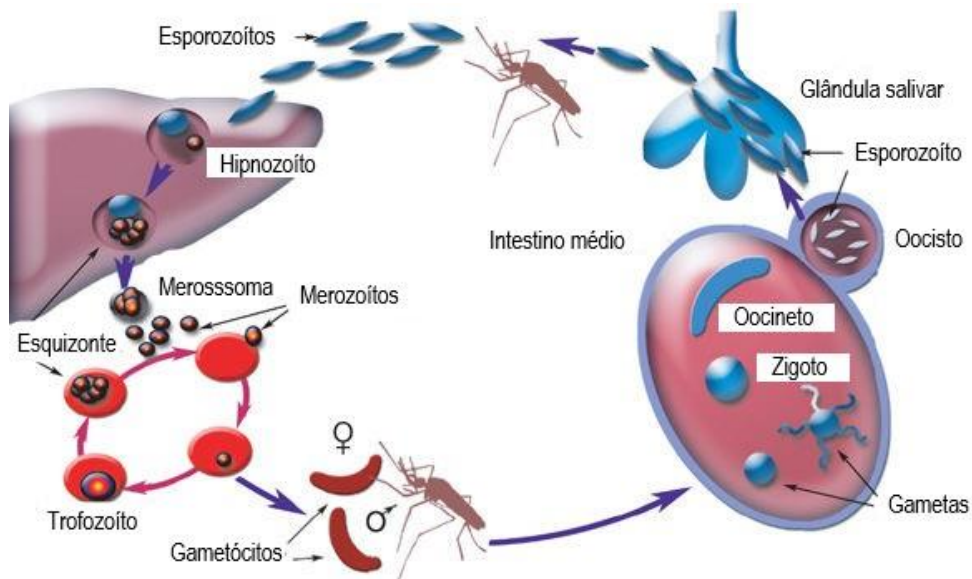


Figura 5: Ciclo biológico do *Plasmodium*. Os esporozoítos são inoculados no hospedeiro vertebrado pela saliva da fêmea do anofelino durante o repasto sanguíneo. Rapidamente estes esporozoítos alcançam o fígado e infectam hepatócitos, onde se replicarão em esquizontes (esquizogonia exo- eritrocítica). Algumas espécies de *Plasmodium*, como *P. vivax* e *P. ovale* apresentam um estágio de dormência do parasito ao infectar hepatócitos conhecida como hipnozoíto, os capacitando a recrudescência da doença semanas ou até anos após a infecção. Após a esquizogonia no hepatócito, merozoítos são liberados na circulação sanguínea onde infectam os eritrócitos, desenvolvem-se em trofozoítos (forma de anel) e realizam uma segunda replicação formando o esquizonte. A hemácia parasitada rompe-se liberando merozoítos que irão infectar outros eritrócitos, ou diferenciar-se em gametócitos (estágio sexual). Os microgametas ♂ e macrogametas ♀ são ingeridos pelo mosquito fêmea do gênero *Anopheles* no repasto sanguíneo, no intestino médio formam o zigoto que se desenvolve em oocineto (forma móvel) e penetram na parede do intestino. A partir da fixação, o oocisto é formado e o parasito multiplica-se (esporogonia) formando esporozoítos. Estes são liberados pelo rompimento do oocisto, migrando para as glândulas salivares do mosquito e no repasto sanguíneo deste, serão inoculados no hospedeiro vertebrado.

Fonte: Adaptado de WINZELER, E. A. Nature, 2008.

Este quadro clínico inicial pode desenvolver-se em malária grave ou complicada, com quadro sintomático de cefaleia forte, hipertermia, vômitos, sonolência, convulsões (em caso de malária cerebral), insuficiência renal aguda, edema pulmonar agudo, hipoglicemia, disfunção hepática, hemoglobinúria e choque. As causas clínicas mais graves são causadas por *P. falciparum*, principalmente em adultos que não possuem nenhum contato prévio com o parasito, crianças e gestantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A maioria das mortes causadas pela malária mundialmente são decorrentes de infecções por *P. falciparum*, que se replicam rapidamente na corrente sanguínea e destrói as hemácias, alterando a homeostasia em diversos órgãos (GOMES et al., 2011). Esta

espécie é responsável pelo desenvolvimento do quadro clínico de malária cerebral e angústia respiratória, decorrentes da obstrução da microcirculação nestes órgãos, o que gera trombos e embolias. Esta obstrução ocorre devido ao fenômeno da citoaderência, processo no qual os eritrócitos infectados se remodelam e tornam-se mais adesivos a outras hemácias e paredes dos vasos sanguíneos. Este remodelamento é resultado da indução pelo parasito do aumento na expressão de moléculas de adesão endoteliais que interagem com a proteína de *Plasmodium* linhagem-específica (PfEMP1) na membrana do eritrócito (CHEN et al., 2000; MILLER et al., 2002; FRANCISCHETTI et al., 2008; MAIER et al., 2009; ZAKI & SHANBAG, 2011; WHITE et al., 2014). Contudo, atualmente casos de *P. vivax* têm causado complicações graves de malária no país, introduzindo citoadesão ao endotélio pulmonar e placenta (DE LAS SALAS et al., 2013; BRUTUS et al., 2013; RAHIMI et al., 2014; WHITE et al., 2014). No Brasil, cerca de 1% dos casos da doença podem chegar a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Diversos estudos vêm sendo realizados na busca de controlar a expansão da malária, entre elas a biologia e interações entre parasito-hospedeiro, implementando metodologias e modelos experimentais mais efetivos para o desenvolvimento de fármacos e vacinas antimaláricas. Para isto, são realizados experimentos com modelos animais, culturas de células e manipulação genética (JONGCO et al., 2006). O modelo murino utilizando *Plasmodium berghei* é largamente utilizado na pesquisa científica para testes *in vivo* de diversas finalidades, entre elas a resposta imunológica à infecção pelo *Plasmodium*, estudos genéticos da organização da resistência a drogas e dinâmica da malária grave. A facilidade no manuseio e criação de ratos e camundongos em laboratório contribui para o sucesso do uso desta espécie de plasmódio na pesquisa *in vivo*, além da facilidade de manutenção do ciclo de vida em laboratório por meio da transmissão cíclica (CARLTON, et al. 2001; MARTINELLI, et al., 2011). O *P. berghei* é um parasito de roedores selvagens do Congo belga, isolado em 1948 em glândulas salivares de *Anopheles duren*i (VINCKE e LIPS, 1948). A cepa NK 65 de *P. berghei* foi isolada primeiramente em 1964, enquanto a cepa ANKA foi isolada em 1966, na mesma espécie de mosquito (KILLICK-KENDRICK, 1978). Camundongos infectados com a cepa ANKA, apresentam sinais neurológicos e histopatológicos semelhantes às encontradas na malária cerebral humana, como hemorragias e sequestro de eritrócitos infectados em microcapilares cerebrais (LOU, et al., 2001; TAYLOR-ROBINSON, 1995). Embora a

infecção pela cepa NK65 não esteja associada a sinais neurológicos, animais infectados com este isolado mostram elevados níveis de parasitemia e lesão hepática no início da infecção, resultando na morte do camundongo em duas semanas (NIIKURA et al., 2008; YOSHIMOTO et al., 1998).

O ciclo de vida de *P. berghei* assexuado é assincrônico, com diferentes estágios sanguíneos encontrados simultaneamente na circulação durante a infecção, com poliparasitismo extensivo e citoplasma com aparência contínua e requer 22-25 horas (FIGURA 6) (QUEIROZ, 2017). Em geral, apresenta produção de 12-18 merozoítos por esquizonte, e tem preferência em invadir reticulócitos, porém também invadem eritrócitos maduros (DEHARO, et al., 1996).



Figura 6: Formas trofozoíticas de *Plasmodium berghei* ANKA no 6º dia após a infecção por 1.10^6 eritrócitos infectados. São características do ciclo de vida do parasito apresentar poliparasitismo, trofozoítos jovens e maduros encontrados simultaneamente.

Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

2.3 Mecanismos de ação de antimaláricos de referência

O conhecimento sobre o ciclo biológico do parasito permite que diferentes estratégias de tratamento sejam desenvolvidas, a fim de eliminar de forma rápida e definitiva a malária. Para que haja eficiência na eliminação do *Plasmodium*, devem ser

focados três pontos do ciclo de vida do parasito: a esquizogonia sanguínea, responsável pela sintomatologia clínica da infecção; os hipnozoítos característicos das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, a fim de eliminar a recrudescência; e a gametogênese, com intuito de interromper a transmissão do parasito para o vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; FATORUSSO e SCAFATI, 2009). Para o tratamento da malária, são postos em prática esquemas de tratamentos com combinação de fármacos, com intuito de abranger as fases do ciclo do parasito (TABELA 1). A maioria dos antimaláricos de referência atua contra a esquizogonia sanguínea, suprimindo as manifestações clínicas e impedindo que a doença progrida. Segundo Cui e colaboradores (2015), são deste grupo de fármacos a cloroquina, quinina, mefloquina e derivados da artemisinina (FIGURA 7).

Tabela 1: Esquema de tratamento para malária preconizado pelo Ministério da Saúde, Brasil.

| ESPÉCIE | TRATAMENTO |
|--|-------------------------------------|
| <i>P. vivax</i> / <i>P. ovale</i> | CQ 3 dias + PQ de 7 a 14 dias |
| <i>P. malariae</i> | CQ 3 dias |
| <i>P. falciparum</i> / malária mista (<i>Pf</i> e <i>Pm</i>) | ACTs 3 dias + PQ dose única |
| Malária mista (<i>Pf</i> + <i>Pv</i> ou <i>Pf</i> + <i>Po</i>) | ACTs 3 dias + PQ de 7 a 14 dias |
| Malária grave (<i>Pf</i> ou <i>Pv</i>) | ART E.V. 6 dias + CL E.V por 7 dias |

Fonte: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2015).

Pf (*Plasmodium falciparum*), *Pm* (*Plasmodium malariae*), *Pv* (*Plasmodium vivax*), *Po* (*Plasmodium ovale*), CQ (cloroquina), PQ (primaquina), ACTs (terapia de combinação baseada em artemisinina), ART (artemisinina), CL (clindamicina), E.V. (endovenosa).

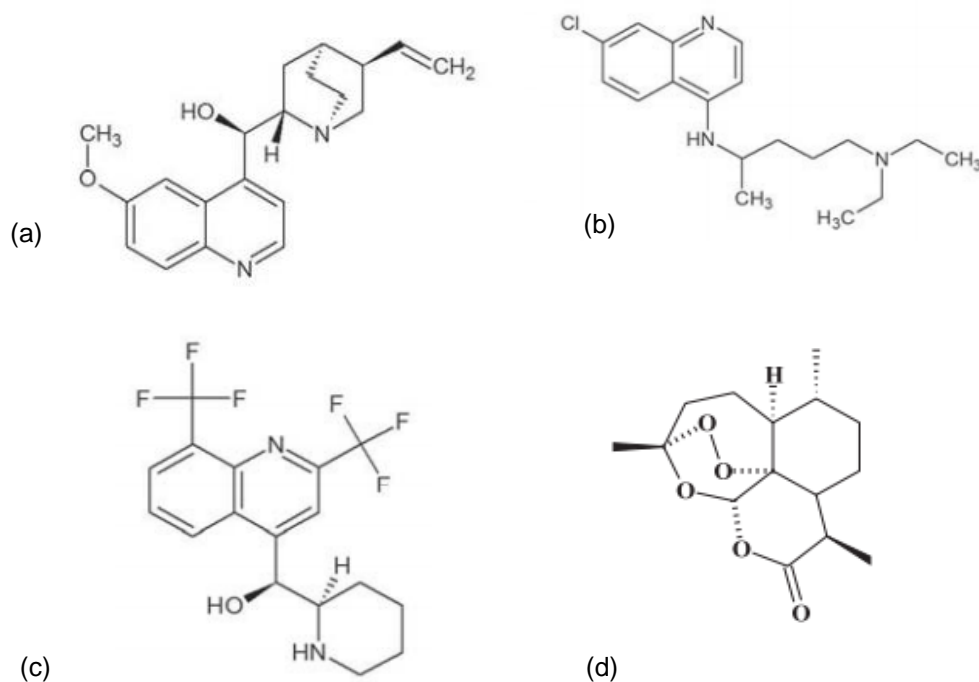


Figura 7: Estrutura química das moléculas de: (a) quinina; (b) cloroquina; (c) mefloquina e; (d) artemisina.

Fonte: Adaptado de Sá (2011); Rodrigues et al. (2006).

Os compostos antimaláricos podem ser divididos de acordo com seus mecanismos de ação. A quinina foi a primeira molécula antimalárica descrita, e dela derivam os principais antimaláricos sintéticos como a amodiaquina, primaquina, piperaquina, mefloquina e cloroquina (MÜLLER e HYDE, 2010). Esta última foi usada como molécula líder contra a malária, apresentando baixa toxicidade, eficácia, baixo custo de produção e fácil administração (BURGESS et al., 2010; SINHA et al., 2014). Os derivados da quinina, exceto a primaquina, atuam no metabolismo heme, ligando-se a ferroprotoporfirina IX, (metabólito derivado da digestão da hemoglobina) inibindo sua polimerização à hemozoína e consequentemente, o processo de detoxificação, causando danos à membrana lisossomal e enzimas do parasito (FITCH, 2004; GARCIA-BUSTOS & GAMO, 2013). Além desta ação, a cloroquina atua na biossíntese dos ácidos nucleicos, degradando os ribossomos e dissimilando o RNA ribossomal dos parasitos (SAIFI et al., 2013). A primaquina é o único derivado quinoleico efetivo na ação contra os hipnozoítos e gametócitos de todas as espécies, interrompendo a cadeia transportadora de elétrons, o que gera lesão oxidativa na mitocôndria do *Plasmodium* (GARCIA-BUSTOS & GAMO, 2013). Atualmente é a única droga registrada que atua contra essas formas, sendo assim,

é usada para interrupção da transmissão da doença do hospedeiro vertebrado para o mosquito vetor.

O desenvolvimento da resistência do parasito a quinina gerou a produção da sulfadoxina e pirimetamina, que atuam na biossíntese do folato. A sulfadoxina, sulfonamida e a dapsona inibem a enzima dihidropteroato sintase (DHPS) e a pirimetamina e o proguanil inibem a dihidrofolato redutase (DHFR) dos parasitos (revisado por FRANÇA et al., 2008; MÜLLER & HYDE, 2010). Porém, rapidamente surgiram os primeiros casos de falha terapêutica na Ásia, América do Sul e África (revisado por FIDOCK et al., 2004; CUI et al., 2015). Apesar, do desenvolvimento de resistência, a combinação sulfadoxina+pirimetamina é utilizada como tratamento em áreas de alta transmissão em grupos de risco, como mulheres grávidas e crianças. Esta associação também interrompe o desenvolvimento da doença, caso o indivíduo seja picado pelo mosquito, além de interromper a infecção placentária assim como as suas implicações no feto (TER KUILE et al., 2007; WARSAME et al., 2010). Já a atovaquona, desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial e inserida no grupo químico das hidroxinaftoquinonas, age como análogo da ubiquinona, ligando-se ao complexo do citocromo *bc1* na cadeia de transferência de elétrons na mitocôndria, levando a morte do parasito. Contudo, casos e cepas resistentes ao uso deste fármaco surgiram na Tailândia e rapidamente se expandiu para outros países (revisado por SAIFI et al., 2013).

Com a necessidade de um antimalárico com mesmas facilidades da cloroquina, a partir de 1980 foi introduzida a artemisina e seus derivados e no final da década 90 sua utilização foi disseminada (WHITE & OLLIARO, 1996). Atualmente, a artemisina e seus derivados (dihidroartemisinina, artemeter e artesunato) são recomendados em associação com outras drogas pela OMS, que tenham diferentes mecanismos de ação e meia-vidas mais longas, para o tratamento de primeira linha contra a malária causada por *P. falciparum* (CUI & SU, 2009). Estes compostos atuam sobre todos os estágios sanguíneos do parasito (SKINNER et al., 1996), incluindo os gametócitos (NOSTEN & WHITE, 2007), porém não inibem o desenvolvimento dos hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* no fígado (WHITE, 2008). Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está claro, sugere-se que a artemisinina aumenta o estresse oxidativo no parasito e reduz os níveis de antioxidantes e glutathione (GSH) (MESHNICK, 2002; CUI & SU, 2009).

Contudo, as terapias unicamente com artemisinina assim como as terapias de combinação já começaram a apresentar falhas no tratamento em cinco países da região do Grande Mekong, no Sudeste Asiático (Camboja, República Democrática Popular do Laos, Myanmar, Tailândia e Vietnã) (WHO, 2016).

2.4 Mecanismos de resistência a antimaláricos

Atualmente, devido ao aumento à resistência dos atuais antimaláricos utilizados no tratamento da doença, pesquisas em torno do desenvolvimento de novas drogas com potencial antiplasmódico são urgentes (GREENWOOD, 2004; NA-BANGCHANG e KARBWANG, 2013). Até o presente momento, três espécies de *Plasmodium* já apresentam resistência aos antimaláricos existentes: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (WHO, 2016).

Muitos são os fatores que podem desencadear a resistência do parasito aos fármacos. Por exemplo, a emergência da resistência à cloroquina, em meados de 1950 pode ter iniciado com o uso globalizado de doses sub- terapêuticas, especialmente ao associar a cloroquina ao sal de cozinha (sal cloroquinado), criando um ambiente ótimo para emergência e sobrevivência de plasmódios resistentes ao fármaco (PAYNE, 1988; VERDRAGER, 1995). A resistência dos parasitos à cloroquina esta associada ao efluxo da droga no vacúolo parasitóforo, estando relacionados a codificação de proteínas de resistência a pfcr1, pfmdr1 e pfmrp1 ou pela mutação na cadeia transportadora de Na^+ / H^+ (MARTIN et al., 1987; WUNSCH et al., 1998). Assim, entre 1970 e 1980, pesquisas acerca de desenvolver e introduzir uma nova droga líder no combate à doença malárica levou à produção da sulfadoxina-pirimetamina. Porém, em poucos anos de inserção no mercado, parasitos resistentes foram identificados. O mesmo seguiu-se com a introdução da mefloquina, amodiquina e artemisina (MARSH, 1998; KORENROMP et al., 2003; PACKARD, 2014). Apesar do crescente aumento da resistência em *P. vivax*, a cloroquina ainda é amplamente usada para tratar casos de malária não causados por *P. falciparum*,

exceto na Indonésia e Papua Nova Guiné, onde a resistência a *P. vivax* é generalizada (CUI et al., 2015).

Outros fatores também podem ter contribuído com a dispersão da resistência a antimaláricos, principalmente em relação ao *P. falciparum*. Além de resistência cruzada entre as drogas, tratamento inadequado e má administração da quimioterapia, mutações genéticas também contribuíram para este processo (TRAPE et al., 1998; WHITE, 2004; ROPER et al., 2004; MAUNE et al. 2009). Genes relacionados com a proteína transmembrana transportadora de resistência a cloroquina (PfCRT/ *Chloroquine Resistance Transporter*), dihidrofolato redutase (DHPS), que atua na ação dos antifolatos, o gene-1 do *P. falciparum* resistente a multidrogas, resistência à mefloquina esta associada a erros na amplificação do gene pfmdr-1 (COWMAN et al., 1994) e mutações no gene do citocromo *b* que confere resistência a atovaquona são alguns exemplos de mutações (TRAVASSOS e LAUFER, 2009). Além disso, recentemente foi associada a mutações no gene PF3D7 134300, que codifica a proteína kelch K13, com a resistência do plasmódio aos derivados de artemisina *in vitro* e *in vivo*. (ARIEY et al., 2014).

2.5 Novos antimaláricos

Com o crescente número de casos no último ano, os alarmantes números de mortes anuais e o aumento da resistência aos antimaláricos utilizados, inúmeros são os esforços direcionados para o controle e tratamento da malária, com objetivo de evitar ou ao menos, minimizar o impacto gerado por esta doença parasitária. Uma das abordagens que têm se destacado e alcançado números significativos na indústria farmacêutica é a pesquisa de drogas de origem vegetal, pois além de haver uma grande biodiversidade mundial, há um patrimônio genético de substâncias isoladas de produtos naturais que através de outro advento importante, a modificação molecular, pode direcionar o desenvolvimento de substâncias para alvos definidos (DI STASI, 2002).

Diversos estudos no Brasil, incluindo do nosso grupo, utilizando extratos de plantas com ação antimalárica vêm se desenvolvendo ao longo dos anos, como o potencial antiplasmodico de óleos essenciais extraídos das plantas *Vanillosmopsis arborea*, *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri*, ou a ação antimalárica de extratos da planta *Bidens pilosa* (ANDRADE-NETO et al., 2004; MOTA et al., 2012; MEDEIROS et al., 2013). Pesquisas em torno de compostos derivados dos extratos destas plantas também são de grande interesse farmacológico, como a investigação da ação antimalárica da criptolepina e seus derivados (ROCHA E SILVA et al., 2012) ou estudos de fármacos sintetizados quimicamente, como os derivados da 1,4-naftoquinona, tem se destacado no meio científico (REZENDE et al., 2013; PEREIRA, 2016).

Porém, o interesse no estudo de espécies de planta com atividades antiplasmodiais já descritas indica que modificações na estrutura desses compostos podem ser igualmente eficientes, uma vez que as estruturas químicas são semelhantes e distribuídas em grupos de espécies relacionadas (ZHU et al., 2002). A quinina tem sido usada nos últimos 350 anos no tratamento, sendo escolhida como princípio ativo em casos de pacientes com *P. falciparum* com resistência a cloroquina (MESHNICK e DOBSON, 2001; RIDLEY, 2002). Em áreas como esta, a quinina continua sendo o tratamento de escolha para malária grave, e para mulheres grávidas até o terceiro semestre, principalmente combinadas a antibióticos (MESHNICK, 1997; ACHAN et al., 2011).

2.6 Cinchonina e associação a metais

A quinina foi a primeira droga específica utilizada para o tratamento contra a malária. É extraída de plantas do gênero *Cinchona* L., Família Rubiaceae, encontradas nas florestas peruanas (HONIGSBAUM, 2001; KAUFMAN e RUVEDA, 2005). Foi introduzida na Europa pelos monges jesuítas no século XVII e utilizada para suprimir a malária em soldados (ROERSH VAN DER HOOGTE e PIETERS, 2015). Logo foi observado que, a partir destas plantas, poderiam ser produzidas diferentes quantidades de compostos alcaloides, sendo a quinina, quinidina, cinchonina e cinchonidina as mais

produzidas, todas com atividade antimalárica, porém com diferentes perfis farmacológicos (BRUCE- CHWATT, 1990).

No início da década de 80, testes *in vivo* apresentaram a cinchonina como composto extraído da *Cinchona* com atividade superior a quinina e a cinchonidina. Ensaios realizados em *P. gallinaceum* e em *P. berghei*, mostraram que cinchonina e quinidina exibiam maior compatibilidade com o local de alta afinidade de captação dos parasitos, a ferriprotoporfirina (WARHURST, 1981). A cinchonina (FIGURA 8), sendo uma base fraca, atravessa o gradiente de pH das hemácias para acumular-se nos vacúolos ácidos dos parasitos (WESELUCHA-BIRCZYNSKA, 2004).

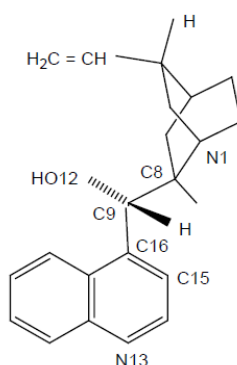


Figura 8: Estrutura química com a numeração dos átomos de cinchonina (cin; C8-S, C9-R).

Fonte: Adaptado de Weselucha-Birczynska, 2004.

Com a perspectiva da disseminação da resistência aos antimaláricos vigentes no tratamento contra a doença, a pesquisa em torno de novos compostos e o que diz respeito às suas aplicações biomédicas, tem se intensificado. Dentro deste contexto, compostos metálicos têm mostrado eficácia na ação antimalárica e são promissores na pesquisa. Biorganometais e complexos metálicos coordenados, tem apresentado resultados de atividade antiplasmódica *in vitro* em formas sanguíneas de cepas de *P. falciparum* do parasito, com valores de IC₅₀ em nível nanomolar (SALAS et al., 2013). Esta estratégia vem fornecendo ferramentas que permitem modificações estruturais em compostos químicos, inclusive farmaceuticamente ativos, capacitando estas moléculas

com seletividade altamente desejável e especificidade. Fatores de terapia de drogas antimaláricas, como biodisponibilidade, solubilidade, toxicidade e especificidade são necessárias para garantir que os medicamentos estejam disponíveis para ação nos locais em que a densidade parasitária é abundante.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antiplasmódica de metalodroga associada à cinchonina.

3.2 Específicos

- Avaliar a atividade antiplasmódica *in vitro* da cinchonina ligada ao cobre e a cinchonina alcaloide contra cepas de *Plasmodium falciparum* de linhagem sensível e resistente à cloroquina (determinação do IC₅₀ – concentração inibitória de 50%);
- Determinar a citotoxicidade dos compostos;
- Avaliar a supressão de parasitemia em modelo murino de *Plasmodium berghei* ANKA;
- Analisar a toxicidade aguda dos compostos testados *in vivo* e os seus efeitos histopatológicos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos

Os compostos utilizados nos testes antimaláricos são derivados da cinchonina e foram sintetizados na Faculdade de Química da Jagiellonian University na Cracóvia, Polônia, sendo eles o Bis [Tetraclorocuprato de cinchonina (II)] tri-hidratado e a cinchonina alcaloide (FIGURA 7). Para os testes *in vivo*, os compostos foram solubilizados em Tween 20 a 2% e/ou água destilada. Para os testes *in vitro*, a solubilização foi realizada em solução estoque com DMSO a 100% e, a partir desta, foi executada diluições para concentração inicial em cada teste, de forma que a concentração final máxima de DMSO foi de 1% para todos os testes.

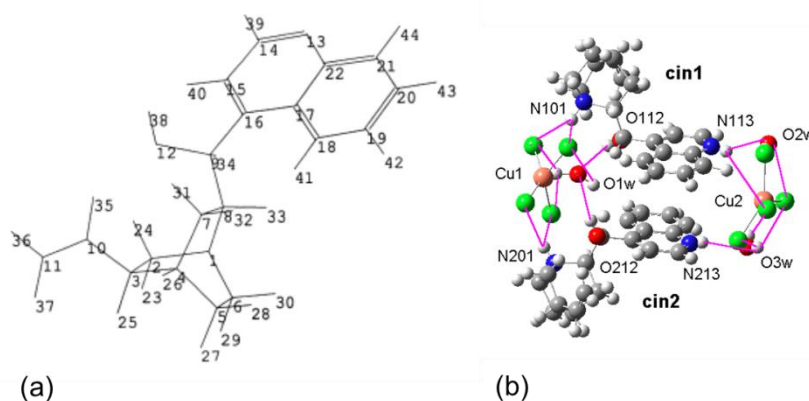


Figura 9: Estruturas químicas dos compostos utilizados.

Imagem (a) referente a estrutura otimizada da cinchonina alcaloide com numeração dos átomos, em que nitrogênio são identificados pelos números 1 e 13; oxigênio pelo número 12; carbonos os outros números menores que 23; e hidrogênio os números de 23-44. A imagem (b) é referente a estrutura assimétrica de Cu (II)- cinchonina contendo dois ânions de CuCl_4^{2-} , dois cátions de cinchonina e 3 moléculas de água (O1w, O2w and O3w).

Fonte: Weselucha-Birczynska e Ciechanowicz-Rutkowska, 2001.

4.2 Manutenção da cultura de *Plasmodium falciparum*

A manutenção da cultura foi realizada segundo o método de Trager e Jensen (1976), modificado por Andrade-Neto e colaboradores (2004). Foi utilizada a cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina, clonada do isolado NF54 (MRA-1000) e a cepa K1 resistente à cloroquina. A cepa foi cultivada mantendo as condições 5% de oxigênio, 5% de dióxido de carbono e 90% de nitrogênio, temperatura a 37 °C, em eritrócitos do tipo O + ou A +, hematócrito de 3 -5% e meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,5% de Albumax I® (Gibco). O desenvolvimento da cultura é analisado pela confecção de esfregaços corados com Giemsa para determinação da parasitemia e estágio de desenvolvimento do parasito. A sincronização da cultura é realizada para conservar a fase em anel dos parasitos, necessária para execução dos ensaios *in vitro*. Basicamente, dois tratamentos consecutivos com solução de D-Sorbitol a 5% (m/v) (Sigma-Aldrich) em um intervalo de 48h são efetuados a fim de lisar os parasitos com maior fragilidade osmótica. Para isto, a cultura é centrifugada a 1.800 rpm por 5 minutos e são adicionados 5 ml de D-Sorbitol a 5% ao precipitado. É realizada uma incubação por 5 minutos a 37 °C, a cultura é centrifugada novamente e adicionado meio RPMI incompleto (LAMBROS e VANDERBERG, 1979).

4.3 Manutenção do modelo murino

Os animais utilizados nos experimentos *in vivo* foram camundongos fêmeas da linhagem Swiss, cedidos pelo biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFRN. Estes animais foram acondicionados em sala experimental com temperatura ambiente de 22°C ± 3°C e umidade relativa entre 30% a 70%, assegurados em condições padronizadas de 12 horas

de luz artificial e 12 horas de escuro. Para alimentação, foi administrada uma dieta convencional de laboratório para roedores, assim como água potável, ambos *ad libitum*. (OECD/OCDE 425, 2008). A manutenção *in vivo*, bem como a utilização de murinos em experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRN, sob o número de protocolo 041.048/2017.

4.4 Manutenção da cepa *Plasmodium berghei* ANKA *in vivo*

O *Plasmodium berghei* ANKA, gentilmente doada pelo GHTM – Global Health and Tropical Medicine, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, é mantido por passagens das formas sanguíneas a cada 7 dias de camundongo para camundongo no Biotério do Centro de Ciências da Saúde (CCS). A escolha do animal doador é determinada pela percentagem de parasitemia após a confecção de esfregaços sanguíneos de camundongos infectados, que são fixados com metanol, corados com solução de Giemsa, e examinados em microscópio ótico (1000x). O sangue do animal doador selecionado (2 gotas de sangue), com 10 a 20% de parasitemia, é coletado por pequena incisão na ponta da cauda. O sangue é recebido em 1 ml de PBS com anticoagulante citrato de sódio 3,8%. O número de hemácias por ml de sangue é determinado, com auxílio de câmara de Neubauer. A partir da percentagem de parasitemia e do número total de hemácias é feita a padronização do inóculo com diluições adequadas do sangue parasitado em PBS-citratado, de modo que cada animal receba 1×10^6 hemácias parasitadas, via intraperitoneal, em um volume final de 0,2 ml (ANDRADE-NETO, 2000).

4.5 Atividade antiplasmodial *in vitro*

A partir dos compostos testados e dos controles, soluções estoque foram produzidas em DMSO a 1%, e realizadas diluições seriadas 1:2 por sete vezes em meio RPMI suplementado com Albumax I[®], sendo a concentração inicial dos compostos derivados da cinchonina de 50 µg/ml e da cloroquina de 2,5 µg/ml. Em placa de 96 poços

foram adicionadas a cultura sincrônica de *Plasmodium falciparum* 3D7 e K1 com parasitemia de 3% e hematócrito a 3% e os compostos diluídos seriadamente em meio RPMI completo. Realizada a diluição, a placa foi incubada por 48 horas a 37°C, e após este procedimento, foram produzidos esfregaços de cada um dos poços da placa, corados com Giemsa e lidos em microscópio óptico para determinação do IC₅₀ (ANDRADE-NETO et al., 2004). Os testes foram realizados em triplicata e a atividade antimalárica foi definida pela supressão de crescimento dos parasitos tratados com os derivados da cinchonina em relação ao controle não tratado e a concentração que inibe 50% do crescimento do parasito (IC₅₀), sendo classificados quanto a sua atividade como: alta atividade (IC₅₀ ≤ 10 µg/ml); atividade moderada (10 < IC₅₀ < 100 µg/ml); baixa atividade (IC₅₀ > 100 µg/ml) (MENEGUETTI et al., 2014).

4.6 Ensaio de citotoxicidade celular

A verificação da taxa de viabilidade celular foi realizada utilizando a capacidade redutora de células sobre o alamarBlue®. Este reagente é capaz de quantificar a proliferação de várias linhagens celulares, permitindo o estabelecimento da citotoxicidade relativa de compostos de várias classes químicas.

O teste de citotoxicidade é utilizado para calcular a dose necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (LC₅₀), valor este necessário para o calculo do Índice de Seletividade (IS) do composto teste. Este índice mede a atividade contra o parasito do composto testado sem causar danos à viabilidade das células do hospedeiro e é calculado dividindo o valor do IC₅₀, obtido nos testes de atividade antiplasmodial *in vitro*, pelo LC₅₀ do composto. Os resultados obtidos acima de 20 são satisfatórios e quanto maior o valor do IS, mais seletiva é a droga em relação ao parasita e menor o efeito nas células hospedeiras (DON & IOSET, 2014).

Sendo assim para a análise da citotoxicidade dos compostos neste trabalho, foram plaqueadas 2,5 x 10⁵ células da linhagem RAW 264.7, macrófagos transformados através de injeção do vírus de leucemia Abelson (RASCHKE, 1978; ABELSON, 1970), em placas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para adesão. Após incubação, o meio de cultura foi removido e, em sequência, adicionado 100 µl de meio

DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) seguido de 50 µl de meio DMEM sem SFB contendo as diferentes concentrações dos compostos testados, em triplicata. Os compostos foram previamente diluídos em DMSO a 1% e as concentrações obtidas seguindo diluições seriadas de 1:2, com concentração inicial de 800 µg/ml e concentração final de 6,25 µg/ml. As células foram mantidas em contato com os compostos durante 24 horas, mantidas em incubação nas mesmas condições citadas anteriormente.

Após as 24 horas, ao abrigo da luz, foi adicionado 10% do volume presente no poço de solução de alamarBlue®, dessa forma, sendo adicionado 15 µl por poço. Além dos poços contendo células e os compostos, foram adicionados poços para o controle negativo (contendo apenas células e DMEM, sem os compostos), o branco (contendo apenas DMEM) e poços com DMEM mais alamarBlue® para o cálculo do fator de correção descrito abaixo. Também foi adicionado um controle positivo, contendo 150 µl de DMSO a 1%. Após aplicação do alamarBlue®, a placa voltou a ser incubada por mais 4 horas para permitir a ação redutora das células viáveis sobre o reagente. Após esse período, a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. Para a análise dos resultados, foram utilizadas as médias e desvios padrões das triplicatas e a porcentagem de alamarBlue® reduzido (ABR%) foi obtido a partir da seguinte equação:

$$ABR\% = \left[\frac{[Aa570 - (Aa600 \times FC)]}{[Ac570 - (Ac600 \times FC)]} \right] \times 100$$

Onde, Aa 570 e Aa600 são os valores das médias das absorbâncias das triplicatas dos compostos testados, a 570 e 600 nm, respectivamente. Ac570 e Ac600 são os valores das médias das absorbâncias das triplicatas do controle negativo. FC representa o valor do fator de correção, calculado a partir dos valores das médias das absorbâncias, onde Ama/Am570 e Ama/Am600 são os valores do meio com alamarBlue® e apenas do meio, a 570 e 600 nm, respectivamente. Dessa forma, o FC sendo obtido de acordo com a equação abaixo:

$$FC = \frac{[Ama570 - Am570]}{[Ama600 - Am600]}$$

4.7 Atividade antiplasmodial *in vivo*

Os testes antimaláricos *in vivo* foram realizados segundo o método supressivo de Peters (1965) e modificado por Carvalho e colaboradores (1991). Camundongos com aproximadamente 6 semanas e peso de 27 g \pm 2 g foram separados em 5 grupos com 4 animais cada, todos inoculados intraperitonealmente com 1×10^6 de eritrócitos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Cada grupo foi tratado de acordo com estas soluções: I grupo controle com água destilada; II grupo controle de água destilada com Tween 20 a 2%; III grupo teste com água destilada e cinchonina ligada ao cobre; IV grupo com água destilada, cinchonina alcaloide e Tween 20 a 2%; V grupo controle com cloroquina. Por 4 dias consecutivos, os animais foram tratados com os compostos testados de acordo com as diluições supracitadas em doses de: 5 mg/kg; 10 mg/kg; 20 mg/kg; 30 mg/kg; 60 mg/kg; e 90 mg/kg em volume final de 200 μ l por animal por via oral (*per gavage*). No 5º e 7º dia após a infecção por *P. berghei* ANKA, esfregaços sanguíneos corados com Giemsa foram examinados em microscópio óptico contando de 1.000-5.000 hemácias, de acordo com a densidade parasitária, para determinação da parasitemia. A supressão de crescimento do parasito nos grupos teste foi calculada em relação aos grupos controle sem tratamento antimalárico (QUADRO 1). A Mortalidade cumulativa dos animais foi observada até 25 dias após a infecção dos animais ou até a morte de todos os animais do grupo controle negativo (tratados apenas com o veículo). Todos os testes foram realizados em triplicata.

$$\% \text{ de supressão} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia do grupo teste}) * 100}{\text{parasitemia do controle}}$$

Equação 1: Cálculo para determinação da porcentagem de supressão de parasitemia.

4.8 Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

Seguindo o protocolo da OECD/OCDE 423 (2001), foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, pesando $27 \text{ g} \pm 2$ gramas com idade entre 6 a 10 semanas não infectados. Cinco grupos de 3 animais selecionados de forma aleatória, nos quais: I grupo controle com água destilada; II grupo controle de água destilada com Tween 20 a 2%; III grupo teste com água destilada e cinchonina ligada ao cobre; IV grupo com água destilada, cinchonina alcaloide e Tween 20 a volume final de 2%; V grupo controle com Cloroquina; para administração via oral (*per gavage*) dos compostos durante 4 dias seguidos. Conforme preconizado pelo guia, a dose inicial testada é de 300 mg/kg de peso corporal. Os animais serão observados diariamente por 14 dias consecutivos e o peso corporal verificado no 1º dia da administração dos compostos e no 15º dia, para cálculo da variação de peso. Sinais como piloereção, mudanças na pele, olhos e mucosas, salivação, diarreia, mudanças no padrão de comportamento e atividade somatomotora, com atenção direta a tremores, convulsões, letargia, sono e coma são anotados e no 15º dia de ensaio, os animais são eutanasiados. Com solução anestésica de concentração de 1:2 de xilazina /quetamina, os camundongos são anestesiados intraperitonealmente e submetidos à necropsia do fígado, baço e rim direito para observação de mudanças macroscópicas patológicas. Estes órgãos foram fixados em paraformaldeído a 10%, e 48h depois, retirados do formol e mantidos em álcool a 70%. Posteriormente, o material foi embebido em parafina, seccionado em micrótomo e corado com hematoxilina-eosina (HE), seguindo a técnica padrão para análise histopatológica em microscópio óptico (10 e 40x de magnitude).

4.9 Análises estatísticas

Os testes antiplasmodiais *in vivo* e *in vitro* foram avaliados segundo a variação entre os grupos tratados e controles aplicando-se o teste de Variância agrupada (ANOVA) e pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, usando o programa Prism 7.1 com significância para o valor de $p < 0,05$ (SILVA & AZEVEDO, 2009). Para o teste de toxicidade aguda foram analisados a média e desvio padrão e para estimar o IC_{50} , foi realizada interpolação linear, em comparação com os controles não tratados, utilizando o software Microcal Origin 13 (NOEDL, 2002).

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antiplasmodial *in vitro*

O IC₅₀ da cinchonina ligada ao cobre foi de 0,06 ± 0,16 µg/ml para 3D7 e 0,04 ± 0,07 µg/ml para K1, enquanto a cinchonina alcaloide foi de 0,23 ± 0,12 µg/ml e 0,06 ± 0,20 µg/ml. O controle positivo (cloroquina) obteve 0,02 ± 0,27 µg/ml contra ambas as cepas de *Plasmodium falciparum* (TABELA 2). Segundo Meneguetti et al. (2014), Todos os compostos testados são de alta atividade antimalárica (IC₅₀ ≤ 10 µg/ml).

Tabela 2: Atividade antiplasmodica *in vitro* realizada por leitura de microscopia para cinchonina ligada ao cobre, cinchonina alcaloide e cloroquina contra as cepas 3D7 e K1. Os valores foram calculados em média e desvio-padrão (triplicata).

| Compostos | IC ₅₀ (µg/ml) ± DP | |
|------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | Cepa 3D7 (sensível à cloroquina) | Cepa K1 (resistente à cloroquina) |
| Cin+Cu | 0,06 ± 0,16 | 0,04 ± 0,07 |
| Cin alc | 0,23 ± 0,12 | 0,06 ± 0,20 |
| Cloroquina | 0,02 ± 0,02 | 0,33 ± 0,02 |

IC₅₀ (Concentração 50% inibitória): alta atividade (IC₅₀ ≤ 10 µg/ml); atividade moderada (10 < IC₅₀ < 100 µg/ml); baixa atividade (IC₅₀ > 100 µg/ml) (Meneguetti et al., 2014). DP: desvio padrão.

5.2 Citotoxicidade

Os valores dos IC₅₀ para os dois compostos testados e a cloroquina encontram-se detalhados na Tabela 3.

Tabela 3: Citotoxicidade e índice de seletividade dos compostos testados em células da linhagem RAW em cepa de *Plasmodium falciparum* 3D7 (sensível à cloroquina) e K1(resistente à cloroquina). Os resultados apresentados estão dispostos em média e desvio-padrão (triplicata).

| Compostos | Citotoxicidade IC ₅₀ µg/ml ± DP | | | |
|------------|--|------------------------|-------------|------------------------|
| | Cepa 3D7 | Índice de seletividade | Cepa K1 | Índice de seletividade |
| Cin+Cu | 1,93 ± 0,34 | 32,1 | 2,01 ± 0,55 | 50,25 |
| Cin alc | 2,81 ± 1,36 | 122,2 | 3,11 ± 1,2 | 51,83 |
| Cloroquina | 1,31 ± 3,7 | 65,5 | 1,01 ± 1,5 | 50,5 |

Índice de seletividade: Valores < 20 indicam baixa ou nenhuma toxicidade; valores > 20 indicam toxicidade moderada a alta dos compostos.

5.3 Atividade antiplasmódica *in vivo*

Os resultados obtidos apresentaram supressão da parasitemia significativas nos dois compostos químicos testados, no qual houve atividade antimalárica igual ou superior a 30% em todas as doses realizadas, sendo considerados parcialmente ativos (CARVALHO et al., 1991). (TABELA 4 e FIGURA 10).

Tabela 4: Atividade antimalárica da cinchonina + cobre e cinchonina alcaloide usando o modelo murino de *Plasmodium berghei* ANKA. Os compostos foram administrados nos camundongos via oral (*per gavage*) por quatro dias consecutivos, cada grupo com quatro camundongos. Os valores das estão calculados em média e desvio- padrão (triplicata) do 5º e 7º dia após a infecção. Os valores entre parênteses são as supressões de parasitemia em porcentagem.

| Dose (µg/ml) | Compostos | Parasitemia +- DP (Supressão da parasitemia em %) | | | |
|-----------------|-----------|---|------------------|------------------------|-------------------|
| | | 5º dia após a infecção | | 7º dia após a infecção | |
| | | Cin+ Cu | Cin alc | Cin+ Cu | Cin alc |
| 5 | | 1,0± 0,82 (51,2) | 1,0± 0,09 (61,5) | 3,1± 0,01 (0) | 2,4± 0,22 (8) |
| 10 | | 1,2± 0,17 (42,7) | 1,4± 0,45 (37,6) | 1,7± 0,09 (34,6) | 1,7± 0,09 (34,6) |
| 20 | | 1,0± 0,17(58,5) | 1,2± 0,63 (51,2) | 2,0± 0,29 (36,9) | 2,6± 0,35 (6,22) |
| 30 | | 1,1± 0,04 (64,9) | 2,0± 0,18 (36,3) | 3,2± 1,78 (30,5) | 3,3± 1,11 (10,1) |
| 60 | | 0,3± 0,03 (87) | 0,3± 0,16 (86,7) | 1,1± 0,11 (64,2) | 0,88± 0,02 (71,2) |
| 90 | | 0,1± 0,00 (93) | 0,1± 0,13 (93,3) | 0,9± 0,09 (68,4) | 1,0± 0,01 (66,9) |

*A supressão de parasitemia foi calculada em relação o grupo de animais do controle não tratado.

A cloroquina, antimalárico padrão utilizado em doses não curativas em camundongos, apresentou média de supressão entre $37,7\% \pm 11,6$ e $94\% \pm 0,5$ em todos os experimentos. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos testados.

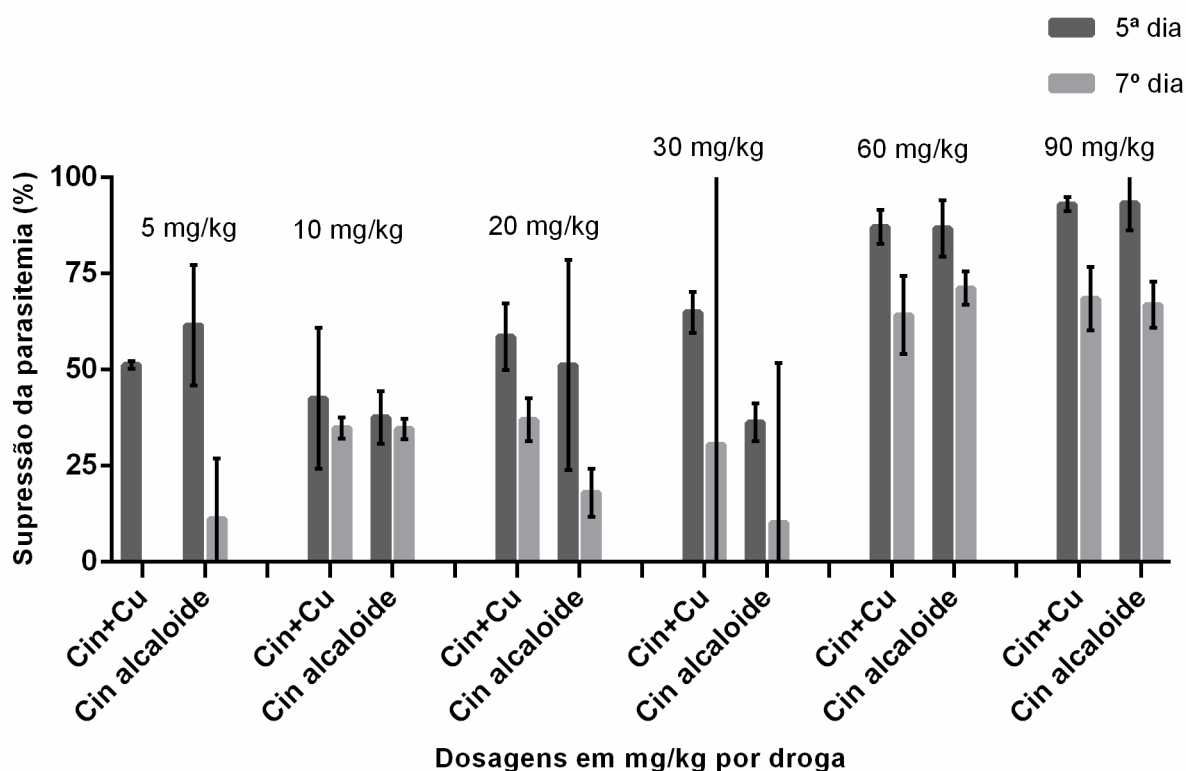


Figura 10: Atividade antiplasmódica da cinchonina ligada ao cobre e cinchonina alcaloide em seis doses (mg/kg). Todos os compostos testados apresentaram supressão de parasitemia superior a 30 %, sendo considerados parcialmente ativos (CARVALHO et al., 1991). O resultado da análise estatística do Two- way ANOVA aplicado ($p < 0,01$), não apresentou diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Os animais foram observados do 1º dia de infecção até o 25º dia após a infecção. Animais tratados com o placebo apresentaram 75% de mortalidade, animais tratados com a cloroquina apresentaram 25% de mortalidade em todas as concentrações testadas. A cinchonina alcaloide obteve 100% de mortalidade dos animais na dose de 30 mg/kg, enquanto a cinchonina ligada ao cobre apresentou 100% de mortalidade na dose de 90 mg/kg (FIGURA 11).

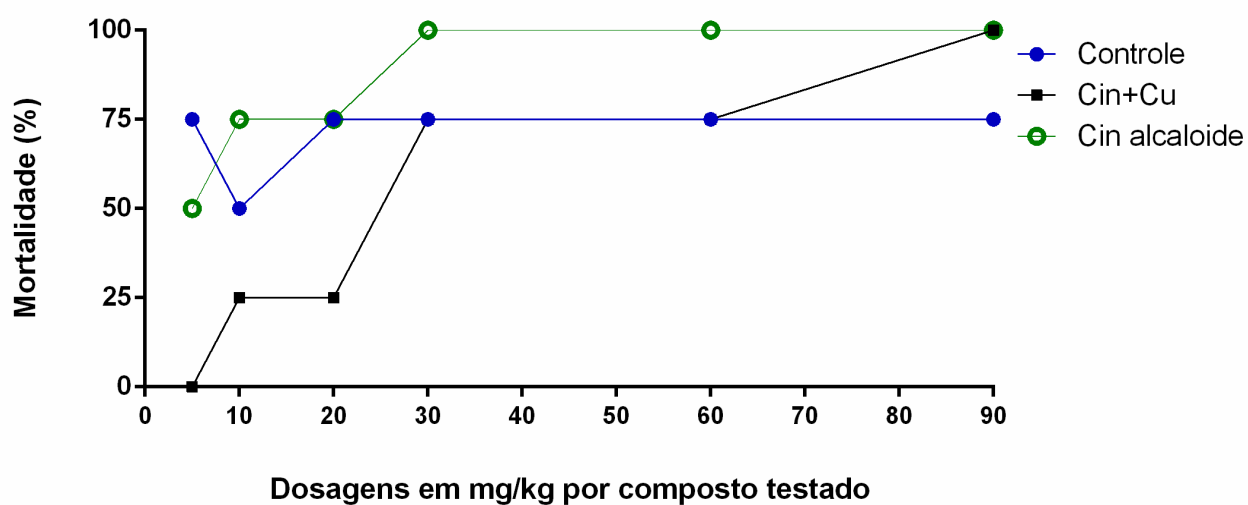


Figura 11: Mortalidade cumulativa em porcentagem dos animais tratados com os dois compostos teste, controle negativo (água + TWEEN 20 a 2%) e cloroquina em relação às doses testadas (mg/kg). Foram testadas seis doses: 5 mg/kg; 10 mg/kg; 20 mg/kg; 30 mg/kg; 60 mg/kg; e 90 mg/kg e os animais acompanhados por 25 dias. Uso de 15 mg/kg para cloroquina. Os valores para cloroquina foram de 25% de mortalidade.

Tabela 5: Atividade antimalárica *in vivo* da cinchonina + Cu e cinchonina alcaloide em relação ao controle não tratado. Grupos de 4 animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA foram tratados por 4 dias consecutivos, e sua mortalidade foi observada por 25 dias a partir da infecção.

| Compostos | Dose (mg/kg) | Mortalidade cumulativa (4 animais por grupo) em dias após a infecção | | | |
|-------------------|--------------|--|----------|----------|----------|
| | | 10º dia | 15º dia | 20º dia | 25º dia |
| Controle negativo | 5 | 2 (50%) | 2 (50%) | 3 (75%) | 3 (75%) |
| | 10 | 0 (0%) | 1 (25%) | 1 (25%) | 2 (50%) |
| | 20 | 2 (50%) | 2 (50%) | 3 (75%) | 3 (75%) |
| | 30 | 2 (50%) | 2 (50%) | 2 (50%) | 3 (75%) |
| | 60 | 2 (50%) | 2 (50%) | 2 (50%) | 3 (75%) |
| | 90 | 2 (50%) | 2 (50%) | 2 (50%) | 3 (75%) |
| Cin+Cu | 5 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| | 10 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (25%) |
| | 20 | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (25%) | 1 (25%) |
| | 30 | 1 (25%) | 2 (50%) | 2 (50%) | 3 (75%) |
| | 60 | 1 (25%) | 1 (25%) | 2 (50%) | 3 (75%) |
| | 90 | 1 (25%) | 1 (25%) | 2 (50%) | 4 (100%) |
| Cin alc | 5 | 1 (25%) | 1 (25%) | 2 (50%) | 2 (50%) |
| | 10 | 0 (0%) | 1 (25%) | 2 (50%) | 3 (75%) |
| | 20 | 0 (0%) | 2 (50%) | 2 (50%) | 3 (75%) |
| | 30 | 3 (75%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) |
| | 60 | 3 (75%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) |
| | 90 | 2 (50%) | 3 (75%) | 4 (100%) | 4 (100%) |

Valores entre parênteses são a porcentagem de mortalidade ao longo dos dias.

Mortalidade cumulativa da droga de referência, a cloroquina (controle positivo) foi de um animal apenas ao final de 25 dias para dose única de 15 mg/kg.

5.4 Toxicidade aguda *in vivo*

Durante os 14 dias de observação dos animais, não houve mortalidade dos animais, porém alguns sinais clínicos foram observados nos animais tratados com as drogas teste (TABELA 6). Os camundongos tratados com cinchonina ligada ao cobre apresentaram piloereção no 4º dia após o tratamento. No 6º dia, os animais tratados com a cinchonina alcaloide e cloroquina também demonstraram sinais de piloereção. Ao final

do teste, todos os animais foram eutanasiados para análise macroscópica dos órgãos e microscópica do fígado, rim direito e baço. As análises macroscópicas não apresentaram alterações morfológicas para os compostos na dose de 300mg/Kg e para o controle não tratado.

Tabela 6: Sinais de toxicidade aguda e mortalidade para os compostos cinchonina ligada ao cobre, cinchonina alcaloide e cloroquina em dose de 300 mg/kg.

| Parâmetros observados | Observações (dose 300 mg/kg) | | |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|
| | Cin+ Cu | Cin alc | Cloroquina |
| Pele e pelos | C.A | C.A | C.A |
| Membranas mucosas e olhos | S.A | S.A | S.A |
| Sinais cardíacos/ respiratórios | S.A | S.A | S.A |
| Padrão de comportamento | S.A | S.A | S.A |
| Atividade somatomotora | S.A | S.A | S.A |
| Salivação | S.A | S.A | S.A |
| Tremores | S.A | S.A | S.A |
| Convulsões | S.A | S.A | S.A |
| Letargia | S.A | S.A | S.A |
| Sono | S.A | S.A | S.A |
| Coma | S.A | S.A | S.A |
| Mortalidade | S.A | S.A | S.A |
| Necropsia | S.A macroscópicas | S.A macroscópicas | S.A macroscópicas |

S.A.: Sem alterações; C.A.: Com alteração.

O peso dos animais variou entre os grupos tratados com as drogas teste, a cloroquina e o grupo controle sem tratamento (FIGURA 12). Os animais tratados com a cloroquina tiveram maior ganho de peso (média de 5 g) em relação aos outros grupos tratados com cinchonina+Cu (média de 0,96 g) e cinchonina alcaloide (média de 1,06 g).

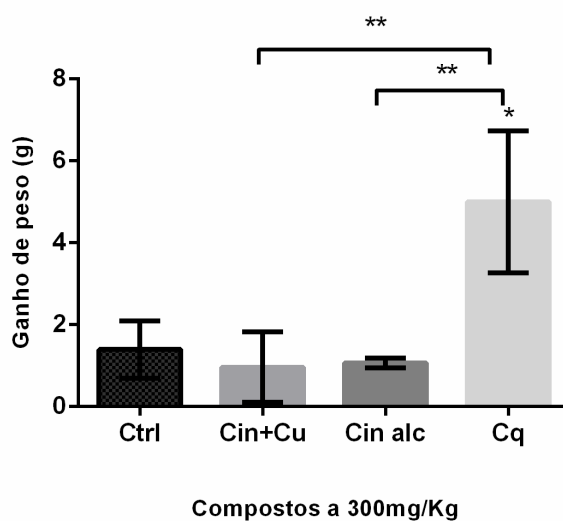


Figura 12: Taxa de ganho de peso nos animais tratados com 300mg/kg. Os dados foram expressos como média e desvio-padrão de 3 animais por grupo. Foi utilizado o ANOVA e teste de Tukey para análises estatísticas. São estatisticamente significantes as variações de peso entre o grupo controle e cloroquina, cloroquina e cinchonina+Cu e cloroquina e cinchonina alcaloide ($p < 0,05$).

As análises macroscópicas dos órgãos dos camundongos não indicaram alterações, porém a análise microscópica do fígado, baço e rim apresentaram alterações morfológicas. No fígado do grupo controle não foi observada lesão reversível ou irreversível, hepatócitos de aspecto normocítico, com citoplasma, núcleo, nucléolo e veia central intactos. Contudo, o fígado do grupo tratado com cin+Cu apresentou infiltrado inflamatório e em camundongos tratados com cin alc foi observado esteatose e infiltrado inflamatório no fígado (FIGURA 13).

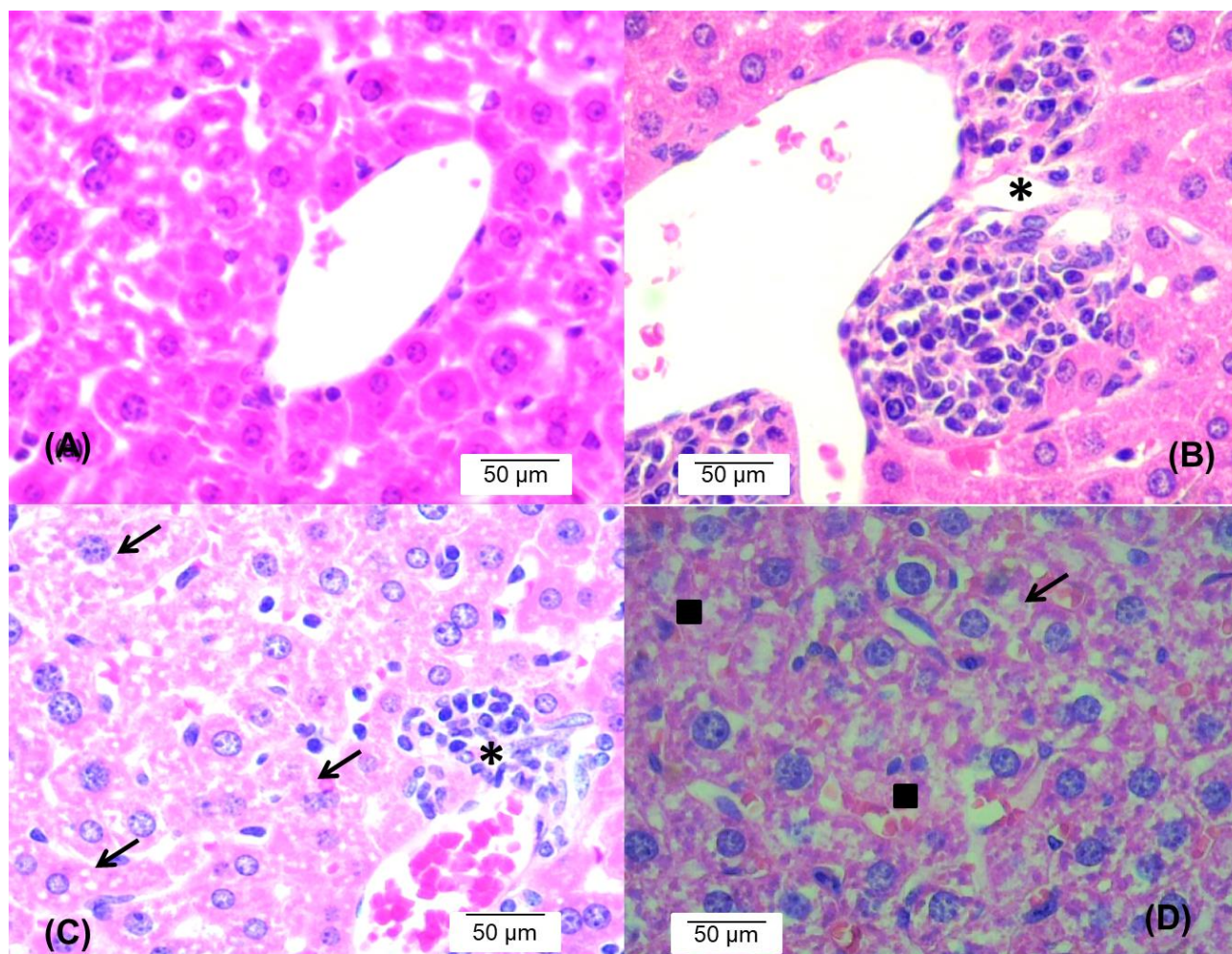


Figura 13: Corte histológico de secções do fígado. Camundongos da linhagem *Swiss* em grupos de quatro animais foram submetidos ao teste de toxicidade aguda na dose de 300 mg/Kg. Após o tratamento via oral (*per gavage*) em (A) com água + Tween 20 a 2% (controle não tratado); (B) com cin+Cu, (C) cin alcaloide e (D) tratados com cloroquina, foram observadas alterações histopatológicas. Os asteriscos nas imagens indicam infiltrado inflamatório, presente no fígado de camundongos tratados com a cinchonina + Cu, cinchonina alcaloide e cloroquina. As setas indicam esteatose hepática nos animais tratados com cinchonina alcaloide e cloroquina. Os quadrados indicam núcleos picnóticos, hepatócitos com ausência de núcleo e presença de macrófagos, sugerido de necrose coagulativa. Coloração com Hematoxilina e Eosina e aumento de 50x de magnitude.

Os cortes histológicos dos rins dos camundongos *Swiss* submetidos ao teste de toxicidade aguda, apresentaram modificações morfológicas em relação ao controle sem tratamento. Rins com aspecto normal foram observados nos animais do grupo controle negativo (sem tratamento). Rins dos animais tratados com as drogas teste apresentaram infiltrado inflamatório, alterações morfológicas que podem indicar nefrotoxicidade na dose administrada (FIGURA 14).

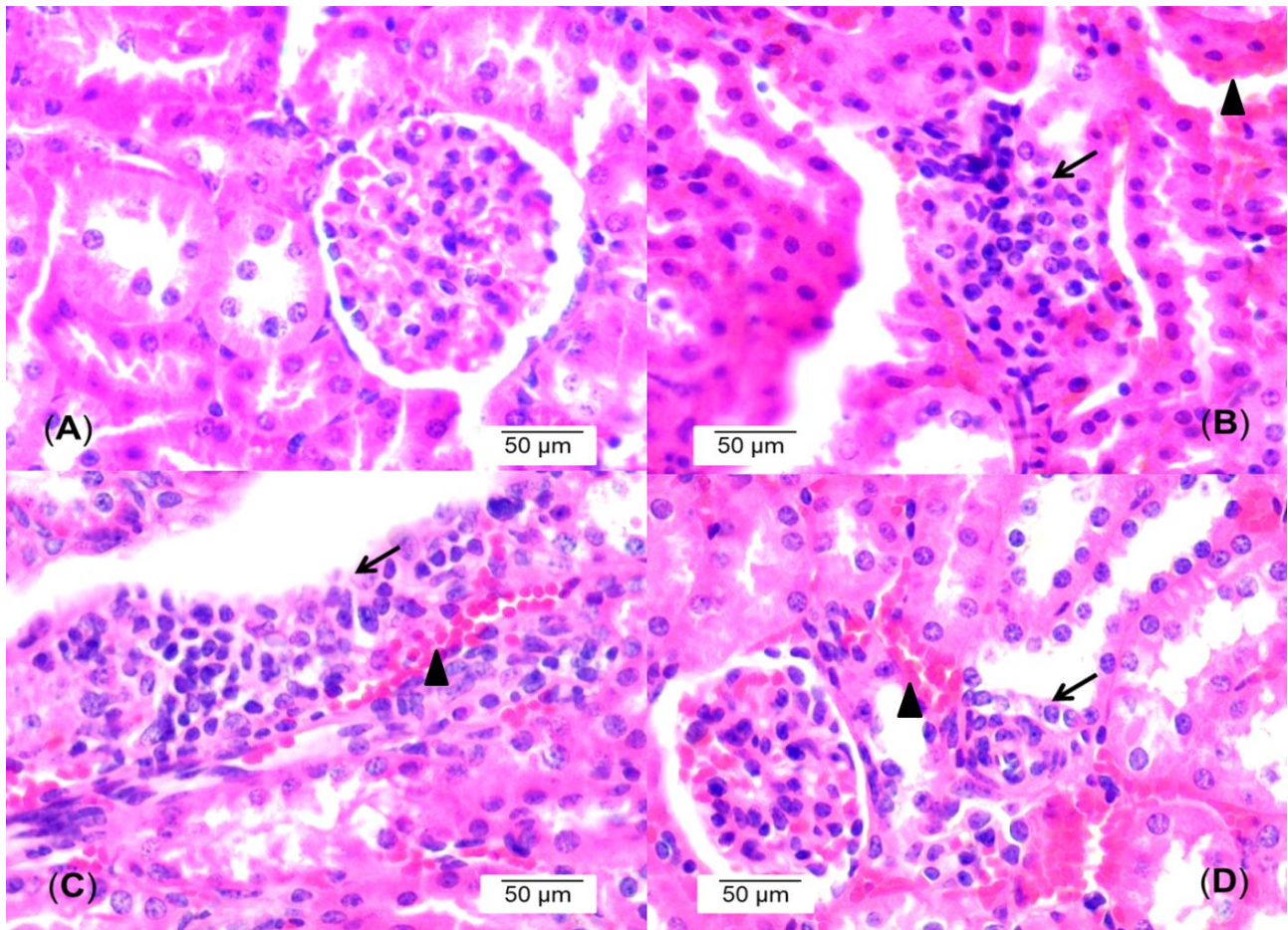


Figura 14: Análise histológica de secções dos rins. Camundongos da linhagem *Swiss* em grupos de quatro animais foram submetidos ao teste de toxicidade aguda na dose de 300 mg/Kg. Após o tratamento via oral (*per gavage*) em (A) com água + Tween 20 a 2% (controle não tratado); (B) com cin+Cu, (C) cin alcaloide e (D) tratados com cloroquina, foram observadas alterações histopatológicas. As setas nas imagens indicam infiltrado inflamatório e os triângulos indicam hiperemia em camundongos tratados com a cinchonina + Cu, cinchonina alcaloide e cloroquina. Coloração com Hematoxilina e Eosina e aumento de 50x de magnitude.

O baço dos animais tratados com as drogas testes apresentou presença de megacariócitos na dose de 300mg/Kg (FIGURA 15). O grupo controle apresentou características morfológicas normais para os baços dos animais.

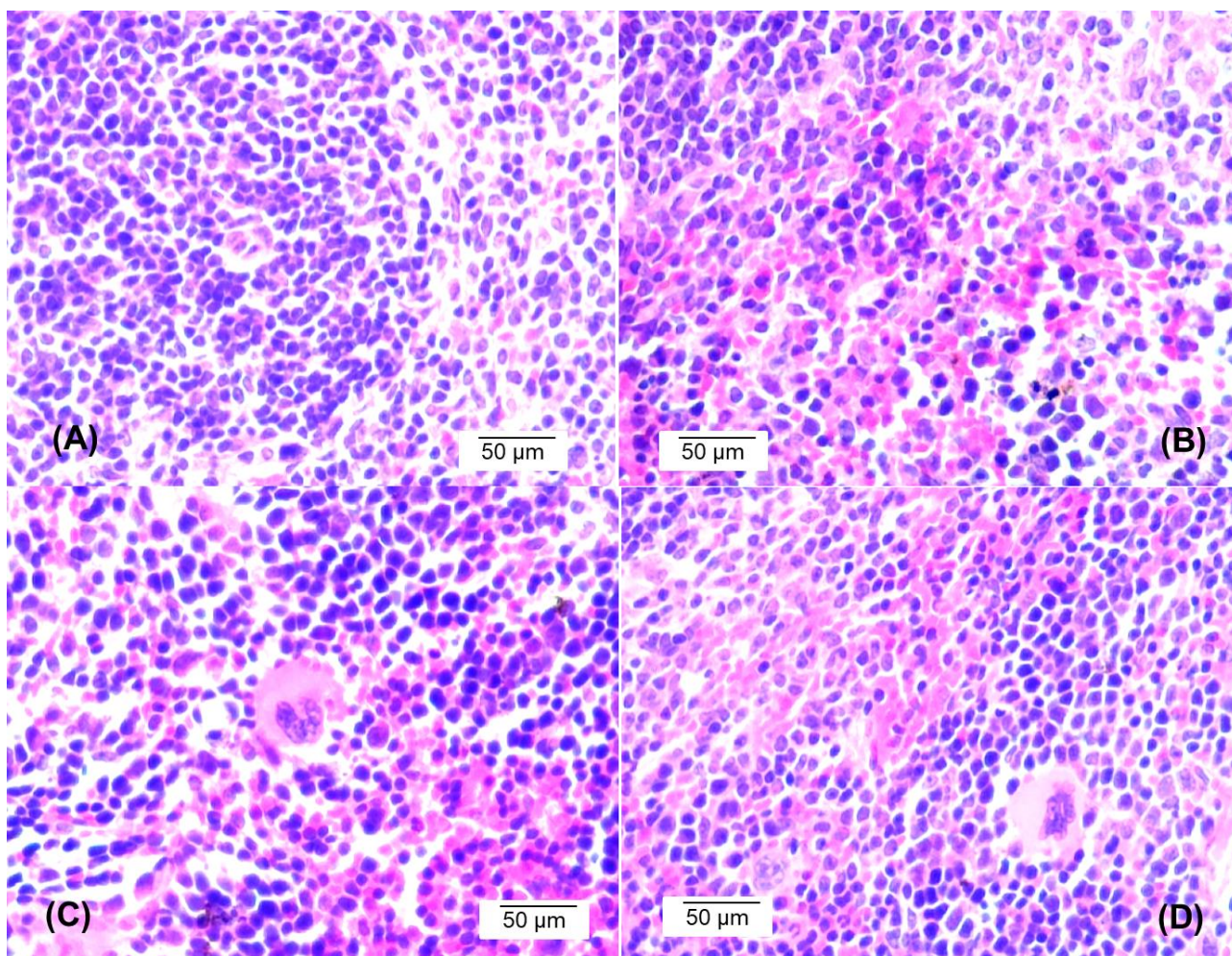


Figura 15: Análise histológica representativa de secções dos baços. Camundongos da linhagem Swiss em grupos de quatro animais foram submetidos ao teste de toxicidade aguda na dose de 300 mg/Kg. Após o tratamento via oral (*per gavage*) em (A) com água + Tween 20 a 2% (controle não tratado); (B) com cin+Cu, (C) cin alcaloide e (D) tratados com cloroquina. Não foram observadas alterações histopatológicas nos baços dos camundongos tratados com nenhum dos compostos testados. Coloração com Hematoxilina e Eosina e aumento de 50x de magnitude.

Foram analisados órgãos de camundongos tratados com cloroquina na dose de 10 mg/kg, valor mais próximo do preconizado pela OMS em testes *in vivo*. O baço dos animais tratados não apresentou alterações morfológicas, com integridade celular mantida em todos os animais. Porém o fígado apresentou pontos de esteatose hepática e infiltrado inflamatório, sugerindo ação hepatotóxica na dose administrada. Alterações morfológicas nos rins também foram observadas como hiperemia tubular e glomerular, sugerindo aumento na taxa de filtração deste órgão na dose de 10 mg/kg de cloroquina (FIGURA 16).

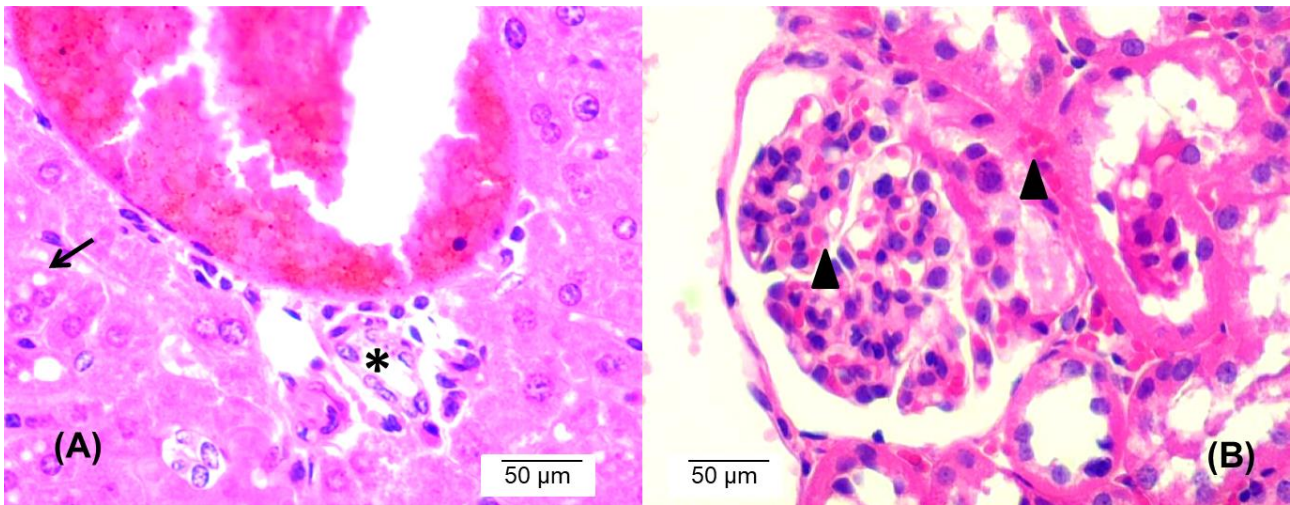


Figura 16: Análise histológica de secções do fígado e rim de animais tratados com cloroquina na dose de 10 mg/kg. Camundongos da linhagem *Swiss* em grupos de quatro animais foram submetidos a análise histopatológica na dose de 10 mg/kg. Foram observadas alterações histopatológicas no: (A) fígado dos animais, apresentado em asterisco infiltrado inflamatório e as setas indicando esteatose hepática. Em (B) podem ser observadas alterações nos rins dos animais com presença de hiperemia tubular e glomerular. Coloração com Hematoxilina e Eosina e aumento de 50x de magnitude.

6 DISCUSSÃO

Uma vez que a principal ferramenta para o controle da malária é a quimioterapia com antimaláricos, é de extrema importância o desenvolvimento de novos fármacos (NA-BANGCHANG e KARBWANG, 2013; ARAMA e TROYE-BLOMBERG, 2014).

A quinina é um composto semi-sintético extraído de cascas de árvores do gênero *Cinchona*, sendo necessário obter o alcaloide a partir de plantações de espécies deste gênero em Java, na Indonésia (OLIVEIRA & SZCZERBOWSKI, 2009). Por cerca de 300 anos, a quinina foi o único medicamento de uso antimalárico, sendo substituído em meados do século XX pelo seu derivado, a cloroquina, de produção mais fácil e menor custo (RATHORE et al., 2005). Atualmente, a quinina é amplamente utilizada no tratamento da malária grave, uma vez que a resistência do plasmódio a este composto tem se mostrado mais baixa em relação à cloroquina e os ACTs (PUKRITAYAKAMEE et al., 1994). Isso pode ser explicado ao se considerar que cepas em circulação do plasmódio talvez já apresentem resistência a quinina em relação às cepas que existiam há 300 anos, desenvolvendo a resistência lentamente ao longo dos séculos e, por isso, nunca foi observado o aumento das doses necessárias para o tratamento. Outra hipótese seria que o uso da quinina não tenha sido em frequência suficiente para exercer pressão evolutiva seletiva até a década de 90, quando houve aumento de casos de resistência ao medicamento (PUKRITAYAKAMEE et al., 1994; MESHNICK, 1997). Estudos em torno de compostos da mesma família da quinina tornaram-se opções viáveis para produção de antiplasmodícos. Modificações no esqueleto alcaloide de derivados da *Cinchona* têm sido uma das estratégias mais bem sucedidas no desenvolvimento de drogas antimaláricas (DINIO et al., 2012).

Derivados da *Cinchona* podem ser arilo amino álcoois, no qual o grupamento arilo é uma quinolina, compostos estes com atividades antimaláricas *in vitro* bem estabelecidas. Contudo os compostos quinidina, hidroxiquinidina e cinchonina apresentam potencial antimalárico superiores, em relação a quinina, hidroxiquinina e cinchonidina (DRUILHE, et al., 1988; WARHURST, et al., 2003).

A atividade antiplasmodíca da cinchonina pôde ser comprovada neste estudo com os resultados de IC₅₀ dos testes de atividade antiplasmodial *in vitro* 0,23 ± 0,12 µg/ml (cepa 3D7) e 0,06 ± 0,20 (cepa K1). Os mesmos resultados promissores foram obtidos

em testes *in vivo*, em que camundongos da linhagem Swiss tratados com doses entre 5 mg/kg e 90 mg/kg obtiveram supressão de parasitemia entre 8% a 93,3%, com resultados superiores no 5º dia após o tratamento por quatro dias consecutivos da cinchonina alcaloide. Isto pode sugerir que a cinchonina seja uma droga de curta ação antimalárica, sendo necessária sua administração por tempo prolongado. Estes resultados são compatíveis com os obtidos em outros estudos, nos quais a cinchonina alcaloide apresenta valores de IC₅₀ de 0,09 µg/ml em mistura de sangue com *Plasmodium falciparum* e entre 0,17 ± 0,09 µg/ml e 0,66 ± 0,10 µg/ml de atividade antimalárica em cepas Dd2 e HB3 de *P. falciparum*, respectivamente (SALAKO et al., 1990; DINIO et al. 2012). Leverrier e colaboradores (2013) observaram o valor de IC₅₀ de 0,09 ± 0,05 µg/ml contra cepa de *Plasmodium falciparum* 3D7 sensível à cloroquina. Testes realizados por Warhurst (1981) em modelo murino de *P. berghei* mostraram que outros derivados da *Cinchona*, como a quinidina e cinchonina, apresentam eficiente atividade antiplasmodial, exibindo uma alternativa ao uso da quinina em casos de resistência. Estes resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, em que a cinchonina alcaloide apresenta e índices de supressão de parasitemia superiores a 30%, considerados compostos parcialmente ativos no modelo *in vivo* (CARVALHO et al., 1991).

Os resultados de citotoxicidade em células RAW tratadas com cinchonina apresentaram índice de seletividade acima de 51, apresentando uma baixa citotoxicidade. A mortalidade cumulativa apresentou 100% de letalidade ao fim de 25 dias de observação após a infecção em doses a partir de 30 mg/kg, sugerindo toxicidade com doses acima das anteriormente mencionadas. Já em testes de toxicidade aguda *in vivo*, utilizando doses de 300 mg/kg por via oral, não foi observada alterações comportamentais e sistêmicas. Esses resultados sugerem poucos efeitos adversos agudos nos animais, uma vez que a dose tóxica foi cerca de 10 vezes a dose terapêutica utilizada nos testes *in vivo* (REZENDE et al., 2013).

O ganho de peso nos animais tratados com 300 mg/kg com cinchonina alcaloide não foi expressivo, sendo estatisticamente significativa somente em comparação com animais tratados com cloroquina. Porém, foram observadas alterações morfológicas em órgãos como o fígado e rim. Alterações sugestivas de hepatotoxicidade como infiltrado inflamatório e esteatose estão presentes em animais tratados com cinchonina alcaloide. As alterações renais como presença de infiltrado inflamatório e hiperemia em túbulos e

glomérulos sugerem maior taxa de filtração renal. Estes resultados são suportados por relatos de efeitos adversos causados pelo uso da quinina e seus derivados como náusea, vômitos, prejuízo na audição, cefaleia, acúfeno e distúrbios na visão, quadro este conhecido como “cinchonismo” (MESHNICK, 1997). Efeitos adversos são usuais em compostos de efeito tóxico, ou causam prejuízos teciduais.

Com o intuito de diminuir a toxicidade e efeitos adversos de drogas antimaláricas de uso recorrente e minimizar a falha terapêutica decorrente das cepas multirresistentes às drogas antimaláricas em uso, tem sido utilizadas várias estratégias, inclusive abordagens mais inovadoras, a fim de desenvolver drogas mais eficazes na cura da malária (TRIPATHY & ROY, 2014). Uma das abordagens promissoras envolve o uso de complexos de metais de transição na produção de antiplasmódicos (SEKHON & BIMAL, 2012). Complexos metálicos têm sido utilizados para uma variedade de doenças, como agentes anticancerígenos, antibióticos, antibacterianos, antivirais, antiparasitários, antiartríticos e radiosensibilizadores agentes, entre outros, pois a coordenação de um sistema farmacológico em que o cerne é metálico tem mostrado resultados de atividade superior de biodistribuição, absorção, metabolismo e efeitos colaterais minimizados (ORVIG & ABRAMS, 1999; CRANS & MEADE, 2013).

Os primeiros trabalhos com síntese de complexos metálicos com propriedades antimaláricas datam de 1987, com a incorporação de íons como Cr^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Sn^{2+} , Ag^+ , Pd^{2+} , Pt^{3+} , Rh^{3+} e Au^{3+} em estruturas quinoleicas como amodiaquina e primaquina (WASI et al., 1987). Atualmente a ferroquina, distribuída pela Indústria farmacêutica Sanofi, é o único metaloantimalárico em fase II de ensaios clínicos, sendo avaliado em associação ao Artemetel (CHAVAIN et al., 2008; CHAVAIN et al., 2009; BIOT et al., 2011). Dentre vários complexos metálicos, os complexos de cobre são bem caracterizados devido seu reconhecimento como agente antiparasítico e antioxidante, e inclusive, vários complexos associados a cobre apresentam atividade antimalárica considerável (BAHL et al., 2010; MEDICI, et al., 2015; WEINTRAUB et al., 2015). Esta capacidade antiplasmódica associada a forte afinidade de ligação dos íons divalentes do Cu^{2+} a aminas proporcionam a associação este metal de transição a fármacos já utilizados no tratamento da malária (MANNING et al., 2013).

Nesse estudo, a cinchonina ligada ao cobre e a cinchonina apresentaram valores de IC_{50} sem diferenças estatisticamente significativas e semelhantes ao valor obtido para

cloroquina, em cepas de *Plasmodium falciparum* sensível e resistente à esta droga. Estes resultados são superiores aos encontrados em complexos de cobre associados a outros compostos com anel de quinolina como 3- (arilazo)-4-hidroxi-1,2-naftoquinona ($IC_{50} > 30$ µg/ml) testadas contra cepa 3D7 de *P. falciparum*, e semelhantes aos resultados do N,N₀-bis (2-metil benzimidazole) pentano diamido (0,02 µg/ml) e ao benziloxibenzilinenopiridina-2-carboxamidrazona (1,25 µg/ml), este último também testado em cepa 3D7 (GOKHALE et al., 2006; MOHAPATRA et al. 2010; GOKHALE et al. 2003).

Apesar dos resultados *in vitro* desta pesquisa não apresentar diferenças estatísticas significativas entre a cinchonina e esta ligada ao cobre, a presença do cobre em antimaláricos tem apresentado potente efeito contra as formas assexuadas sanguíneas *in vitro* em testes com *Plasmodium falciparum* (TAPANELLI et al., 2016). Os resultados de citotoxicidade foram semelhantes aos apresentados em células RAW tratadas com cinchonina. O índice de seletividade da cin+Cu foi acima de 20 para as duas cepas testadas, mostrando baixa ação citotóxica nas células do hospedeiro. Contudo, estes valores de índices de seletividade podem ser variáveis de acordo com diversos fatores como a linhagem de célula utilizada e o composto associado ao metal de transição (GOKHALE et al., 2006; MOHAPATRA et al. 2010; GOKHALE et al. 2003; TAPANELLI et al., 2016).

Resultados dos testes *in vivo* mostraram que a cinchonina+Cu possui atividade supressiva de parasitemia entre 0% a 93% semelhante à cinchonina alcaloide, que apresentou supressão de 8% a 93,3%. Já em relação à mortalidade cumulativa, os dados sugerem que a Cinchonina ligada ao cobre causa um menor efeito adverso em modelo murino quando comparado à cinchonina alcaloide, uma vez 100% da letalidade só foi atingida na maior dose testada. Nos testes de toxicidade aguda na dose de 300 mg/kg, não foram observadas mudanças comportamentais ou sistêmicas, porém apesar dos resultados da mortalidade cumulativa mostrarem-se promissores em relação à cinchonina alcaloide. Infiltrados inflamatórios foram encontrados nos rins e fígados dos camundongos, contudo não houve presença de esteatose em animais tratados com cin+Cu. Nos rins também foram presentes hiperemia tecidual.

Chen e colaboradores (2006), observaram efeitos tóxicos no fígado, rins e baço em camundongos expostos oralmente a nanopartículas de cobre e zinco.

O uso de nanopartículas metálicas ou a formação de complexos de metais tem o potencial de ajustar o uso de drogas antimaláricas consideradas antigas e tóxicas, aprimorando a biodisponibilidade e reduzindo a toxicidade destas (SANTOS-MAGALHÃES & MOSQUEIRA, 2010). Esta abordagem permite o uso de baixas doses do fármaco considerado tóxico, diminuindo os riscos ao paciente e melhora a eficiência da droga ao limitar o alvo de ação antiplasmódica, diminuindo o risco de desenvolvimento de resistência (BAIRD, 2005). Esta potencialização da ação de compostos antimaláricos junto ao cobre sugere que a complexação deste metal às drogas proporciona certo grau de seletividade, no qual este complexo é preferencialmente tóxico ao parasito e menos tóxico às células normais. Isto ocorre devido ao potencial redutor do cobre, que reduz facilmente ativando o oxigênio intracelular, podendo ser um dos mecanismos da sua atividade antiparasítica, além disso, a toxicidade do uso do metal é reduzida pela complexação dos metais de transição à droga, tornando o metal mais inerte durante a sua interação com biomoléculas (KRUNGKRAI et al., 1998; SÁNCHEZ-DELGADO et al., 2004).

A atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* da cloroquina foi similar a resultados apresentados em outros trabalhos, com valores de IC_{50} descritos na Tabela 2 em cepas de *P. falciparum* resistentes e sensíveis à cloroquina, e porcentagem de supressão de parasitemia em *Plasmodium berghei* entre 80 a 95% (MOHAPATRA et al. 2010; DINIO et al. 2012; TAPANELLI et al., 2016; ANDRADE-NETO et al. 2004; ANDRADE-NETO et al. 2003). Já os resultados referentes à toxicidade *in vitro* da cloroquina em relação à cinchonina e a cinchonina com o cobre foram similares, onde cin+ Cu, cinchonina e cloroquina apresentaram índice de seletividade acima de 20, todos apresentando baixa toxicidade em células RAW. Os testes de mortalidade e toxicidade aguda apresentaram resultados superiores às drogas testadas. Contudo, a análise histopatológica dos órgãos de animais tratados com a cloroquina a 300 mg/kg mostraram danos maiores nos tecidos hepáticos do que dos demais compostos analisados. A presença de picnose celular e ausência de núcleo em alguns hepatócitos sugerem necrose tecidual nesta dose aguda. Animais tratados a dose de 10 mg/kg de cloroquina apresentaram esteatose e infiltrado inflamatório, assim como os resultados observados na cinchonina e cinchinina + Cu.

A maioria das drogas antimaláricas usadas na quimioterapia tem efeitos adversos em seu uso. Erupções cutâneas, náusea, vômito, diarreia, dores de cabeça, dor

abdominal e febre, causam mal-estar, levando o paciente a abandonar o tratamento na melhora clínica inicial, o que pode provocar recidivas. Além desses sintomas, outros efeitos adversos variados são causados pelos antimaláricos, como a quinina, sulfadiazina e primaquina, que adquirem anemia hemolítica em deficientes da enzima G6PD (ALKADI, 2007; DAVANÇO et al., 2014). Além da anemia hemolítica, a primaquina pode causar cianose pela produção de metahemoglobina, e leucocitose (ALKADI, 2007; FERNANDO et al., 2011; DAVANÇO et al., 2014). O tratamento completo com quinina, ou em casos de superdosagem, provoca cinchonismo, com sintomatologia de dor de cabeça, zunido nos ouvidos, congestão cerebral e exantema, além de hipoglicemia e hipotensão (ALKADI, 2007). Agranulocitose e hepatotoxicidade são causados pela administração de amodiaquina e sulfadiazina (GIMNIG et al., 2006; ALKADI, 2007). O uso da cloroquina pode acarretar poliúria, decorrente da supressão da resposta ao antidiurético vasopressiva (VON BERGEN e BLOUNT, 2012).

Estes resultados são significativos para pesquisas de compostos com atividade antiplasmodial, principalmente com associação a metais como potencializadores de sua ação. Apesar da citotocidade e toxicidade tecidual de ambos compostos terem sido semelhantes, foi verificada uma diminuição significativa mortalidade dos animais tratados com a cinchonina.

Assim, compostos com associação de metais como platina, manganês, zinco ou cobre podem ser promissores agentes antiplasmódicos. Contudo, pesquisas futuras sobre as características físico-químicas dos complexos metálicos, melhores formas de associação destes metais aos compostos e seus mecanismos de ação antiparasitária precisam ser realizados, incluindo pesquisas sobre o potencial destes metalocomplexos na inibição da transmissão de formas gametocíticas para os mosquitos vetores, durante o repasto sanguíneo mostram-se de grande necessidade para análise do potencial destas drogas bloqueando a infecção no mosquito *Anopheles*. Essa abordagem deverá ser iniciada em breve por nosso grupo.

7 CONCLUSÃO

- Os compostos cinchonina e cinchonina ligada ao cobre apresentaram significativa atividade antiplasmódica, com alta atividade antimalárica quando testadas contra a cepa *Plasmodium falciparum* sensível ou resistente à cloroquina;
- Ambos os compostos obtiveram moderada citotoxicidade *in vitro*. Contudo o aumento do espectro das diluições dos compostos necessita ser realizada para resultados mais robustos acerca da citotoxicidade;
- Os testes antimaláricos *in vivo* apresentou uma satisfatória supressão de parasitemia, sem diferenças estatísticas para os dois compostos. Entretanto, animais tratados com cinchonina+Cu apresentaram 100 % de letalidade apenas na maior dose testada, enquanto a cinchonina apresentou a partir da dose de 30 mg/kg;
- A análise histopatológicas dos órgãos de animais tratados com 300 mg/kg de cada composto mostrou moderada hepatotoxicidade com inflamação pontual no tecido e esteatose. Alterações nos rins também ocorreram com presença de hiperemia sugestiva de aumento na taxa de filtração para os dois compostos. Resultados semelhantes foram observados em camundongos tratados com cloroquina na dose de 10 mg/kg, porém alterações de maior toxicidade hepática ocorreram na dose de 300 mg/kg de cloroquina;

8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

- I. Estudos futuros sobre as características físico-químicas da cinchonina ligada o cobre e seus mecanismos de ação antimalárica deverão ser realizados;
- II. Ensaios de bloqueio de infecção usando *Plasmodium vivax*, a partir de sangue de pacientes em modelo de *Anopheles aquasalis* serão realizados em cooperação com a FIOCRUZ já no segundo semestre de 2018;

REFERÊNCIAS

- ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A. et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malária. **Malaria. Journal**. v. 10, pag.144, 2011.
- ADL, S. M.; et al. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.
- ADL, S. M.; et al. The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429-514, 2012.
- ALAVI, Y.; ARAI, M.; MENDONZA, J.; TUFET-BAYONA, M.; SINHÁ, R.; FOWLER, K.; BILLKER, O.; FRANKE-FAYARD, B.; JANSE, C. J.; WATERS, A.; SINEDN, R.E. The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **International Journal of Parasitology**. v. 34, n.2, pag. 245-247, 2004.
- ALECRIM, M. C.; ALECRIM, W.; MACÊDO, V. Plasmodium vivax resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n. 1, pag 67-68, 1999.
- ALEXANDRE, M.A.; FERREIRA, C.O.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.L.; MOURÃO, M.P.G.; LACERDA, M.V.; ALECRIM, M.G.C. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, n. 10, p.1611-1614, 2010.
- ALKADI, H. O. Antimalarial drug toxicity: a review. **Chemotherapy**, v. 53, p. 385-391, 2007.
- ANDRADE-NETO, V. F. Atividade Antimalárica de Extratos Brutos, Frações Semi-purificadas e de Compostos Quimicamente Definidos Isolados de Plantas Utilizadas Na Medicina Popular. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas-ICB, Laboratório de Malária-CPqRR/Fiocruz. 2000.
- ANDRADRE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; STEHMANN, J.R.; OLIVEIRA, L.A.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants udes to treat fever and malária in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 87, pag 253-256, 2003.

ANDRADRE-NETO et al. Antimalarial Activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) Ethanol Extracts From Wild Plants Collected in Various Localities or Plants Cultivated in Humus Soil. **Phytotherapy Research**. v. 18, pag. 634-639, 2004.

ANDRADE-NETO, V. F.; et al. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 359-365, 2007.

ARAMA, C.; TROYE-BLOMBERG, M. The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. **Journal of Internal Medicine**, v. 275, p. 456-466, 2014.

ARIEY, F. Et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malária. **NATURE**. v. 505, n. 7481, pag 50-5, 2014.

BAIRD, J.K. Effectiveness of antimalarials drugs. New England Journal of Medicine. v. 15, n. 352, pag. 1565-1577, 2005.

BAHL, D.; ATHAR, F.; SOARES, M.B.P. SANTOS DE SA, M.; MOREIRA, D.R.M; SRIVASTAVA, R.M.; LEITE, A.C.L.; AZAM, A. Structure-activity relationships of mononuclear metal-thiosemicarbazone complexes endowed with potent antiplasmodial and antiamoebic activities. **Bioorganic Medical Chemistry**. v. 18, pag. 6857–6864, 2010.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and Their Control**. 2nd ed. Springer, 2010.

BILLKER O.; LINDO, V.; PANICO, M.; ETIENNE, A.E.; PAXTON, T.; DELL, A.; ROGERS, M.; SINDEN, R.E.; MORRIS, H.R. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. **Nature**, v. 392, pag.289-292. 1998.

BIOT, C.; NOSTEN, F.; FRAISSE, F.; TER-MINASSIAN, D.; KHALIFE, J.; DIVE, D. The antimalarial ferroquine: from bench to clinic. **Parasite**. v. 3, n. 18, pag 2017-214, 2011.

BOAKYE, K.; et al. Patterns of Household Insecticide Use and Pyrethroid Resistance in *Anopheles Gambiae Sensu Stricto* (Diptera: Culicidae) within the Accra Metropolis of Ghana. **African Entomology**, V. 17, n. 2, p. 125-130, 2009.

BRESSAN, C. C. A.; Brasil, P. Infecção fulminante por *Plasmodium falciparum* em missionária proveniente do Continente Africano: Relato de Caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 119, 2009.

BRUCE-CHWATT, L. Cinchona and quinine: a remarkable anniversary. **Interdisciplinary Science Review**. v. 15, pag. 87–93, 1990.

BRUCE, M.C.; ALANO, P.D.; CARTER, R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, v.100, pag. 191-200. 1990.

BRUTUS, L.; SANTALLA, J.; SCHNEIDER, D.; AVILA, J.C.; DELORON, P. *Plasmodium vivax* Malaria during pregnancy. **Emerging Infection Diseases**. v. 10, n. 19, pag 1605-1611, 2013.

BURGESS, S. J.; et al. Synthesis, structure-activity relationship, and mode-of-action studies of antimalarial reversed chloroquine compounds. **Journal Medical Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6477-6489, 2010.

CARLTON, J.M.-R.; HAYTON, K.; CRAVO, P.V.; WALLIKER, D., 2001. Of mice and malária mutants: unraveling the genetics of drug resistance using rodent malaria models. **Trends of Parasitology**. v.17, pag. 236–241, 2001.

CARVALHO et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 11, p. 1113-1123, 1991.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/index.html>. Acesso em: 12/101/2018.

CHAVAIN, N.; VEZIN, D.; DIVE, D.; TOUATI, N.; PAUL, J.F.; BUISINE, E.; BIOT, C. Investigation of the redox behavior of ferroquine, a new antimalarial. **Molecular Pharmacology**. v. 5, pag. 710-716, 2008.

CHAVAIN, N.; DAVIOUD-CHARVET, E.; TRIVELLI, X.; MBEKI, L.; ROTTMANN, M.; BRUN, R.; BIOT, C. Antimalarial activities of ferroquine conjugates with either glutathione reductase inhibitors or glutathione depletors via a hydrolyzable amide linker. **Bioorganic Medical Chemistry**. v. 17, pag. 8048–8059, 2009.

CHEN, C.; MENG, H.; XING, G.; ZHAO, Y.; JIA, G.; WANG, T.; YUAN, H.Y.C.; ZHAO, F. CHAI, Z.; ZHU, C.; FANG, X.; MA, B.; WAN, L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicological Letters*. v. 163, pag. 109-120, 2004.

CHUNGH, M.; et al. Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. **PNAS**, v. 110, n. 14, p. 5392 – 5397, 2013.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006.

CRANS, D.C.; MEADE, T.J. Preface for the fórum on metals on medicine and health: New opportunities and approaches to improving health. **Inorganic Chemistry**. v. 52, pag. 12181-12183, 2013.

CUI, L.; SU, X. Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 8, p. 999-1013, 2009.

CUI, L.; et al. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, Suppl 3, p. 57-68, 2015.

DAVANÇO, M. G.; et al. Evaluation of antimalarial activity and toxicity of a new primaquine prodrug. **PLoS one**, v. 9, n. 8, 2014.

DEHARO, E.; COQUELIN, F.; CHABAUD, A. G.; LANDAU, I. The erythrocytic schizogony of two synchronized strains of *Plasmodium berghei* NK65 and ANKA, in normocytes and reticulocytes. **Parasitology Research**. v. 82, n.2, pag. 178-182, 1996.

DE SÁ, I.M. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**. v.18, n.2, p.407-430, 2011.

DE LAS SALAS, B.; SEGURA, C.; PABÓN, A.; LOPES, S.C.P.; COSTA, F.T.M; BLAIR, S. Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HVMVEC-L) of *Plasmodium vivax* isolates from Colombia. **Malaria Journal**. v. 12, pag. 347, 2013.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical atlantic Forest. **Fitoterapia**. v.73, pag. 69-91, 2002.

DINIO, T.; GORKA, A.; Mc GINNISS, A.; ROEPE, P. D.; MORGAN, J. B.; Investigating the activity of quinine analogues versus chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, pag. 3292-3297, 2012.

DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**. v. 141, n. 01, p. 140-146, 2014.

DRUILHE, P.; BRANDICOURT, O.; CHONGSUPHAJASINHHHI, T.; BERTHE, J. Activity of combination of three cinchona bark alkaloids against *Plasmodium falciparum in vitro*. **Antimicrobial Agents of Chemoterapy**. v. 32, pag. 250-254, 1988.

EGAN, T. J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. **Journal of Inorgorganic Biochemistry**, v. 102, n. 5-6, p. 1288–1299, 2008.

FATTORUSSO, E. SCAFATI, O.T. Marine antimalarials. **Marine drugs**. v. 7, p.130-152, 2009.

FIDOCK, D. A., *et al.* Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature Review Drug Discovery**, v. 3, p. 509-520, 2004.

FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.agencia.fiocruz.br>. Acesso em: 12/01/2018.

FITCH, C. D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. **Life Sciences**, v. 74, n. 16, p.1957-1972, 2004.

FRANCISCHETTI, I. M.; *et al.* Blood coagulation, inflammation and malaria. **Microcirculation**, v.15, n. 2, p. 81-107, 2008.

FRANÇA, T. C. C.; *et al.* Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FREVERT, U. et al. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. **Journal Experimental Medicine**, v. 177, p. 1287–1298, 1993.

GARDINER, D. L.; et al. *Plasmodium falciparum*: new molecular targets with potential for antimalarial drug development. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 9, p. 1087-1098, 2009.

GARCIA-BUSTOS, J. F.; GAMO, F. J. Antimalarial drug resistance and early drug discovery. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 22, p. 270-281, 2013.

GARDNER, M. J.; et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, p. 498-511, 2002.

GIMNIG, J. E.; et al. Severe cutaneous reactions to sulfadoxine-pyrimethamine and trimethoprim-sulfamethoxazole in Blantyre District, Malawi. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 74, n. 738, 2006.

GOKHALE, et al. Synthesis and characterization of copper(II) complexes of pyridine-2-carboxamidrazones as potent antimalarial agentes. **Inorganica Chimica Acta**. v. 349, pag. 23-29, 2003.

GOKHALE, N.H.; SHIRISHA, K.; PADHYE, B.P.; CROFT, S.L; KENDRICK, H.D.; McKEE, V. Metalloantimalarials: Synthesis, X-ray crystal structure of potent antimalarial copper (II) complex of arylazo-4-hydroxy-1,2-naphthoquinone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 16, pag. 430-432, 2006.

GOMES, A. P.; et al. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011.

GREENWOOD, B. The use of anti-malarial drugs to prevent malaria in the population of malaria-endemic areas, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n. 70, pag. 1-7, 2004.

HARPSTRITE, S.E.; BEATTY, A.A.; COLLINS, S.D.; OKSMAN, A.; GOLDBERG, D.E.; SHARMA, V. Metalloantimalarials: targeting of *P. falciparum* strains with novel iron(III) and gallium(III) complexes of an amine phenol ligand. **Inorganic Chemistry**. v. 42, n.7, pag. 2294-2300, 2003.

HOFHEINZ, W.; MERKLI, B. Quinine and Quinine Analogues .In: Antimalarial Drugs II, Eds. W. Peters and W. H. G. Richards, Capítulo 2, Springer-Verlag, Berlin, 1984.

HONIGSBAUM, M. The Fever Trail: The Hunt for the Cure for Malaria. **Macmillan**, Londres, 2001.

JIDE, C.; et al. Toll-like receptors, a double-edged sword in immunity to malaria. **Journal of Medical Colleges of PLA**. v. 24, n. 2, p. 118-24, 2009.

JONGCO, A.M.; TING, L.M.; THATY, V.; MOTAC, M.M; KIMA, K. Improved transfection and new selectable markers for the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* . **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 146, pag. 242–250. 2006.

KALANTARI, P.; FITZGERALD, K., A.; GOLENBOCK, D. A. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v.14, p. 744 – 757, 2014

KAUFMAN, T. S.; RUVEDA, E. A. (2005). The quest for quinine: those who won the battles and those who won the war. *Angewandte Chemie International Edition*. v. 44, pag. 854–885, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. Taxonomy, Zoography and Evolution. IN: KILLICK-KENDRICK, R. & PETERS, W. Rodent Malaria. Londres. **Academic Press**, pag. 1-52, 1978.

KORENROMP, E.L.; WILLIAMS, E.G.; GOUWS, E.; DYE, C; SNOW, R. W. Measurement of trends in childhood malaria mortality in African: Na assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. **Lancet Infectious Disease**. v. 3, n.6, pag. 349-358, 2003.

KRETLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V.F., BRANDÃO, M.G.L., FERRARI, W.M.S., 2001. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** . v. 96, pag. 1033–1042, 2001.

KRETLI, A.U.; ADEBAYO, J.O.; KRETLI, L.G. Testing of Natural products and Synthetic molecules a migrant new antimalarials. **Current Drug Targets**. v. 10, n. 3, 2009.

KRUNGKRAI, S.R.; YUTHARVONG, Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 5, n. 81, pag. 710-714, 1987.

KUDOM, A. A.; et al. Assessment of anti mosquito measures in households and resistance status of *Culex* species in urban areas in southern Ghana: Implications for the sustainability of ITN use. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 859 – 864, 2013.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 418-420, 1979.

LAPOUBLE. OM.M.; SANTELLI, A.C.F.S.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. **Revista Panamericana de Salud Publica**. V. 38 n.4, p. 300–306, 2015.

LEVERRIER, A.; BERO, J.; FRÉDÉRICH, M.; QUENTIN-LECLERCQ. J.; PALERMO, J. Antiparasitic hybrids of *Cinchona* alkaloids and bile acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.66, pag. 355-363, 2013.

LOU, J.; LUCAS, R.; GRAU, G. E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clinical Microbiology Review*. v. 14, n.4, pag. 810-820, 2001.

MAIER, A. G.; et al. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. **Nature Review Microbiology**, v. 7, 2009.

MANNING, et al. Structural and some medicinal characteristics of the copper(II)–hydroxychloroquine complex. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 23, pag. 4453-4458, 2013.

MANDAL, S. Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: global spectrum. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 13-26, 2014.

MARSH, K. Malaria disaster in Africa. **Lancet**. v. 352, n. 9132, pag. 924, 1998.

MARTIN, S.K.; ODUOLA, A.M.; MILHOUS, W.K. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. **Science**. Nº 235, pag. 899- 901, 1987.

MARTINELLI, A.; HENRIQUE, G.; CRAVO, P.; HUNT, P., 2011. Whole genome re-sequencing identifies a mutation in an ABC transporter (*mdr2*) in a *Plasmodium chabaudi* clone with altered susceptibility to antifolate drugs. **International Journal of Parasitology**. v. 41, pag. 165–171, 2011.

MAUNE, R.J.; PONTAVORNPINYO, W.; SARALAMBA, S. AGUAS, R.; YEUN, S.; DONDORP, A.M.; DAY, N. P.; WHITE, N.J.; WHITE, L. J. The last man standing is the most resistant: eliminating artemisinin-resistant malaria in Cambodia. **Malaria Journal**. v. 8, pag.31, 2009.

MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V.M.; LACHOWICZ, J.I.; CRISPONI, G.; ZORODDU, M.A. Noble metals in medicine: latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*. v. 284, pag. 329–350, 2015.

MENEGUETTI, D. U. O.; et al. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 577-587, 2014.

MESHNICK, S.R. Why does quinine still work after 350 years of use? **Parasitology Today**. v.13, pag. 89-90, 1997.

MESHNICK, S.R., DOBSON, M., 2001. The history of antimalarial drugs. In: Rosenthal, P. Antimalarial Chemotherapy. Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery. **Humana**, pp. 15–16, 2001.

MESHNICK, S. R. Why does quinine still work after 300 year of use? **Parasitology today**. v 13, n. 3, pag 89-90, 1997.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal of Parasitology**, v.32, p.1655–1660, 2002.

MILLER, L. H.; et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Resolução CNS 251/97. Sistema de Vigilância em Saúde, 1997.

MINISTERIO DA SAÚDE (Brasil). Coordenação Geral no Programa Nacional de Controle da Malária. **Malária no Brasil**. Sistema de Vigilância em Saúde, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília, v. 46, n. 25. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. 2017. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/malaria/bases/malabrnet.def>>. Acesso em 12/01/2018.

MIOTO, L.D.; GALHARDI, L. C. F.; AMARANTE, M.K. Parasitological and immunological aspects of malária. **Biosaúde**, v. 14, n. 1, 2012.

MOHAPATRA, S.C.; TIWARI, H.K.; SINGLA, M.; RATHI, B. SHARMA, A. MAHIYA, K.; KUMAR, M.; SINHA, S.; CHAUHAN, S.S. Antimalarial evaluation of copper (II) nanohybrid solids: inhibition of plasmepsin II, a hemoglobina-degrading malarial aspartic protease from *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. v. 15, pag. 373-385, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÜLLER & HYDE. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. **Future Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 1857-1873, 2010.

MUELLER, I.; et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Disease**, v. 9, p. 555-566, 2009.

NA-BANGCHANG, K. KARBWANG, J. Emerging artemisinin resistance in the border áreas of Thailand. **Expert Review of Clinical Pharmacology**. v. 6, n. 3, pag. 307-322, 2013.

NIKURA, M.; KAMIYA, S.; KITA, K.; KOBAYASHI, F. Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. *Journal of Immunology*. v. 180, pag. 6877-6884, 2008.

NOEDL H. Non linear evaluation of malaria drug sensitivity data (HN-NonLin V1.1).

NOSTEN, F. & WHITE, N. J. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p.181-192, 2007.

OECD. Guidelines 423, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. In **OECD Guidelines for Testing of Chemicals**, OECD: Paris, France, p. 1-14, 2001.

OECD. Guidelines 425, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. In **OECD Guidelines for Testing of Chemicals**, OECD: Paris, France, p. 1-14, 2008.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.B.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**. V. 9, p.115, 2010.

OLIVEIRA, A.R.M; SZCZERBOWSKI, D. Quinine: 470 years of history, controversy and Science development. **Química Nova**. v.32, n.7, 2009.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. Acesso em 30 de março de 2018. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812

ORVIG, C.; ABRAMS, M.J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. **Chemical Reviews**. v.9, n. 99, pag. 2201-2204, 1999.

PACKARD, R.M. The origins of antimalarial-drug resistance. **New England Journal of Medicine**. v. 371, n.5, pag. 397-399, 2014.

PATRÍCIA-BRASIL, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Global Health**. v.5, pag. 1038–1046, 2017.

PAULO, A.; et al. Bis-alkylamine Indolo[3,2-*b*]quinolines as Hemozoin Ligands: Implications for Antimalarial Cytostatic and Cytocidal Activities. **Medicinal Chemistry** v. 57, p. 3295-3313, 2014.

PAYNE, D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*?. **Parasitology today**. v. 4, pag. 112-115, 1988.

PEREIRA, V.S.S. Derivados de 2-hidroxi-3-anilino-1,4-naftoquinona: atividade antiplasmodial *in vitro*, toxicidade e interferência na biossíntese de isoprenóides. **Tese (Doutorado em Bioquímica)**. Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2016.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips1948. 3. Multiple drug resistance. **Experimental Parasitology**, p. 97-102, 1965.

PINA-COSTA, A.; et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618-633, 2014.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; SUPANARANOND, W.; LOOAREESUWAN, S.; VANIJANONTA, S.; WHITE, N. J. Quinine in severe falciparum malaria: evidence of declining efficacy in Thailand. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 88, pag. 324-327, 1994.

QUEIROZ, N.L. Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65. 2007. p. 93. **Dissertação para título de mestre**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, 2007.

QUINTERO, J.P.; SIQUEIRA, A.M.; TOBÓN, A.; BLAIR, S.; MORENO, A.; ARÉVALO-HERRERA, M.; LACERDA, M.V.; VALENCIA, S.H. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, n.25. p. 16348-16353, 2002).

RAI, M.; INGLE, A. I.; PARALIKAR, A. I.; GUPTA, I.; MEDICI, S.; SANTOS, C. A. Recent advances in use of silver nanoparticles as antimalarial agentes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 526, pag. 254–270, 2017.

RAHIMI, B. A.; *et al.* Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malaria Journal**, v. 13, n. 481, 2014.

RATHORE, D.; MCCUTCHAN, T. F.; SULLIVAN, M.; KUMAR, S. Antimalarial drugs: current status and new developments. *Expert Opinion of Investigational Drugs*, v. 14, pag. 871-873, 2005.

REZENDE, L. C. D.; *et al.* *In vivo* antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 6, p. 4583-4586, 2013.

RIDLEY, R.G., 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. **Nature**. N. 415, pag. 686–693, 2002.

RODRIGUES, R.A.F.; FOGLIO, M.A.; BOAVENTURA-JÚNIOR, S.; SANTOS, A.S.; REHDER, V.L.G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**. v. 29, n. 2, pag. 368-372, 2006.

RODRÍGUEZ, J.C.P.; URIBE, G.A.; ARAÚJO, R.M.; NARVÁEZ, P.C.; VALENCIA, S.H. Epidemiology and control of malaria in Colombia. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v.106, pag. 114–122, 2011.

ROPER, C.; PEARCE, R.; NAIR, S.; SHARP, B.; NOSTE, F.; ANDERSON, T. (2004) Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. **Science**, n. 305, pag. 1124, 2004.

ROERSCH VAN DER HOOGTE, A.; PIETERS, T. Science, industry and the colonial state: a shift from a German-to a Dutch-controlled cinchona and quinine cartel (1880–1920). **History and Technology**. v.31, pag. 2–36, 2015.

SAIFI, M. A.; BEG, T.; HARRATH, .H; ALTAYALAN, F.S.H; QURASHY, S.A; Antimalarial drugs: Mode of action and status of resistance. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 7, nº 5, pag. 148-156, 2013.

SALAS, P.F.; HERMANN, O.C. Metalloantimalarials. **Chemical Reviews**. v. 113, n.5, pag 3450-3492, 2013.

SALAKO, L.A.; SOWUNMI, A.; LAOYE, O.J.; ADEROUNMU, A.F. Combination of quinine, quinidine and cinchonine for the treatment of acute falciparum malária: correlation with the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to the cinchona alkaloids *in vitro*. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 84, pag. 626-629, 1990.

SÁNCHEZ-DELGADO, R.A.; ANZELLOTTI, A.; SUÁREZ, L. Metal complexes as chemotherapeutic agentes against tripocal diseases: malária, trypanosomiasis and leishmaniasis. **Metal ions in biological systems**. n. 41, pag. 379-419, 2004.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; MOSQUEIRA, V.C.F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Advanced Drugs Delivery Reviews*. v. 62, pag. 560-575, 2010.

SEKHON, B.S.; BIMAL, N.J. Transition metal-based antimalarial. **The American Journal of Pharmmaceutical Educational Research**. v. 3, pag. 52-63, 2012.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SINDEN, R. E. Molecular interactions between Plasmodium and its insect vectors. **Cellular Microbiology**, v. 4, pag. 713-724. 2002.

SINHA, S.; et al. "Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir," **AAPS Pharm-SciTech**, v. 11, n. 2, p. 518–527, 2010.

SINKA, M. E.; et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 69, 2012.

SIVEP-MALÁRIA/SVS - Ministério da Saúde. Dados atualizados em: 054/01/2018. * Dados de 2017 são preliminares, podendo sofrer alterações. Disponível em: <https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1517_2018_01_04/casos_notificados_2017_regio_Amaznica>

SKINNER, T. S.; et al. *In vitro* stagespecific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 519-525, 1996.

TAYLOR-ROBINSON, A.W. 1995. Murine models of cerebral malaria: a qualified defence. **Parasitology Today**. v. 11, pag. 407-409, 1995.

TER KUILE, F. O.; et al. Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: a systematic review. **JAMA** v. 297, p. 2603–2616, 2007.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, n. 193, p. 673-675, 1976.

TRAPE, J.F.; PISON, G.; PREZIOSI, M.P.; ENEL, C.; DESGREES DU LOU, A.; DELAUNAY, V.; SAMB, B.; LAGARDE, E.; MOLEZ, J.F.; SIMONDON, F. Impact of chloroquine resistance on malária mortality. **Comptes Rendus De l'Academie Des Sciences**. Serie III, v. 321, pag. 689–697, 1998.

TRAVASSOS, M.A.; LAUFER, M.K. Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacologic, and clinical considerations. **Pediatric Research**. v. 65, n.5, pag. 64-70, 2009.

TRIPATHY, S.; ROY, S. A review of age old antimalarial drug ti combat malária: efficacy up-gradation by nanotechnology based drug delivery. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. pag. 673-679, 2014.

VERDRAGER, J. Localized permanent epidemics: the genesis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**. v. 26, pag. 23-28, 1995.

VINCKE, I.H., LIPS, M. [Not available]. **Annais Society of Belgian Medicine Tropical**. v. 28, pag. 97-104, 1948.

VON BERGEN, T. N.; BLOUNT, M. A. Chronic use of chloroquine disrupts the urine concentration mechanism by lowering cAMP levels in the inner medulla. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 203, n. 6. p. F900-F905, 2012.

WARHURST, D.C. Cinchona alkaloids and Malaria. **Lancet**, v. 12, pag. 1346, 1981.

WARHURST, D.C.; CRAIG, J.C.; ADAGU, I.S.; MEYER, D.J.; LEE, S.Y. The relationship of physico-chemical properties and structure to the differential antiparasmodial activity of the *Cinchona* alkaloids. **Malaria Journal**. v. 26, n. 2, pag. 1475-1478, 2003.

WARSAME, M.; *et al.* Role of medicines in malaria control and elimination. **Drug Development Research**, v. 71, n.1, p. 4–11, 2010.

WASI, N.; SINGH, H.B.; GAJANANA, A.; RAICHOWHARY, A.N. Synthesis of metal complexes of antimalarial drugs and in vitro evaluation of their activity against *Plasmodium falciparum*. **Inorganic Chemistry Acta**. v. 135, pag. 133-137, 1987.

WEINTRAUB, S.; MOSKOVITZ, Y.; FLEKER, O.; LEVY, A.R.; MEIR, A.; RUTHSTEIN, S.; BENINSVY, L.; GRUZMAN, A. SOD mimetic activity and antiproliferative properties of a novel tetra nuclear copper (II) complex. **Journal of Inorganic Chemistry**. v. 20, pag. 1287-1298, 2015.

WESELUCHA-BIRCZYNSKA, A.; OLEKSYN, B. J.; HOFFMANN, S.K.; ŚLIWINSKI, J.; BORZECKA-PROKOP, B.; GOSLAR, J.; HILCZER, W. Flexibility of CuCl₄-tetrahedra in bis[cinchoninium tetrachlorocuprate(II)] trihydrate single crystals. X-ray diffraction and EPR studies. **Inorganic Chemical**. v. 40, pag. 4526 – 4533, 2001.

WESELUCHA-BIRCZYNSKA, A. Aggregation phenomena of cinchonine in aqueous solutions observed and analysed by 2D FT-Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**. v. 35, pag. 189–198, 2004.

WINZELER, E. A. Malaria research in the post-genomic era. **Nature**. v. 455, pag. 751-756, 2008.

WHITE, N.; OLLIARO, P. Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination chemotherapy for malaria. **Parasitology Today**, v. 12, p. 399–401, 1996.

WHITE, N.J. Antimalarial drug resistance. **Journal Clinical Investiment**. v. 1130, pag.1084–1092, 2004.

WHITE, N. J. Qinghaosu (Artemisinin): The price of success. **Science**, v. 320, p. 330-334, 2008.

WHITE, N. J.; *et al.* Malaria. **Lancet**. v. 383, p. 723-735, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2015**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2015**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2016**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 15-18, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2017**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 15-16, 2017.

WUNSC, S.; SANCHEZ, C.P.; GEKLE, C.P.; WORTMANN, L.G.; WIESNER, J.; LANZER, M. Differential stimulation of the Na¹/H¹ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. **Journal of Cell Biology**. nº 140, pag. 335-345, 1998.

YOSHIMOTO, T.; TAKAHAMA, Y.; WANG, C.R.; YONETO, T.; WAKI, S.; NARIUCHI, H. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. **Journal of Immunology**. v. 160, pag. 5500-5505, 1998.

ZAKI, S. A.; SHANBAG, P. Atypical manifestations of malaria. **Journal of Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 2, p. 9-22, 2011.

ZHU, F.; QIN, L.; TAO, X.;LIU, Z.;SHI, X.; MA, J.; JIA, Y. TAN, C.; CUI, J. L. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. **Proceedings of National Academy of Science**. v. 108, n.31, pag. 12943–12948, 2011.